

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude du rôle des médiateurs apparentés au thromboxane dans l'athérosclérose: effets de modulateurs originaux sur les cellules musculaires vasculaires

Copine, Christophe

Award date:
2009

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des sciences

**Etude du rôle des médiateurs apparentés au thromboxane dans
l'athérosclérose : effets de modulateurs originaux sur les cellules
musculaires vasculaires**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Christophe COPINE

Janvier 2009

**Etude du rôle des médiateurs apparentés au thromboxane dans
l'athérosclérose : effets de modulateurs originaux sur les cellules
musculaires vasculaires**

COPINE Christophe

Résumé

Les maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose représentent, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde. L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique complexe, résultat de nombreuses interactions entre les lipoprotéines modifiées, les macrophages dérivés des monocytes et les différents éléments de la paroi artérielle. Le recrutement des monocytes dans la paroi artérielle requiert l'expression de diverses classes de molécules d'adhérence telles que la *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) ou l'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) à la fois à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Chez les patients souffrant d'athérosclérose, les concentrations plasmatiques de thromboxane A₂ et de 8-*iso*-PGF_{2α} sont anormalement élevées. Ces deux molécules sont capables de se lier au récepteur du thromboxane A₂ et de l'activer. Cependant, les conséquences de cette activation dans les cellules musculaires lisses sont encore peu connues.

Notre objectif était d'évaluer les effets de deux agonistes (le U46619 et 8-*iso*-PGF_{2α}) et les effets de deux antagonistes (SQ29548 et BM-520) du récepteur au thromboxane A₂ sur la régulation de l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1 dans les cellules musculaires lisses humaines (HVSMSs).

Nous avons montré que les agonistes du récepteur TP étaient capables d'inhiber l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 induite par l'IL-1β. D'autre part, ils stimulent la sécrétion de MCP-1 dans les HVSMSs. Ces effets du U46619 et 8-*iso*-PGF_{2α} sont levés par l'ajout du SQ29548 et du BM-520. Cet effet inhibiteur des agonistes sur l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 induite par l'IL-1β ne passe pas par une modulation des voies de signalisation conduisant à l'activation des facteurs de transcription AP-1 ou NF-kB. L'ensemble de ces résultats indiquent que les agonistes du récepteur TP pourraient donc jouer à la fois un rôle anti-inflammatoire en diminuant l'expression des molécules d'adhérence mais aussi pro-inflammatoire en augmentant la sécrétion de MCP-1.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: J.-M. Dogné

Co-Promoteur: C. Michiels

Arrivé au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mes promoteurs, Monsieur J.-M. Dogné et Madame C. Michiels, pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire.

Merci à C. Michiels pour son encadrement, son enthousiasme, sa disponibilité, ses nombreux commentaires enrichissants et le temps qu'elle m'a consacré.

Merci à J.M. Dogné pour ses nombreux encouragements, son regard critique, sa disponibilité, et la confiance qu'il m'a accordé durant ce travail.

Je remercie également S. Rolin-Beauthier, pour son encadrement tout au long de ce travail, son dynamisme, sa disponibilité et sa sympathie.

Je tiens à remercier également tous les membres du département de pharmacie et du laboratoire URBC pour leur accueil chaleureux, et en particulier l'équipe HIF pour leurs conseils avisés et leur aide.

Mes remerciements s'adressent aussi à C. Cherdon, qui m'a accueilli pendant plus d'une semaine au CHU (ULg), et qui m'a fait prendre conscience de l'aspect « physique » de l'athérosclérose. Merci pour son encadrement et sa gentillesse.

Merci à tous mes amis, sur qui j'ai pu compter à n'importe quel moment et surtout à Ludovic, pour ses nombreux coups de mains. Merci à Sarah pour sa patience et le soutien qu'elle m'a apporté tout au long de cette année.

A ma famille, qui m'a toujours soutenu durant ces cinq années d'études et qui n'a jamais douté de moi.

Et enfin, je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de porter un regard critique sur ce travail. D'emblée, je vous souhaite une agréable lecture...

**Etude du rôle des médiateurs apparentés au thromboxane dans l'athérosclérose :
effets de modulateurs originaux sur les cellules musculaires vasculaires**

COPINE Christophe

Erratum

p.39 point III.1.5. intitulé « **Effets des agonistes et des antagonistes sur l'abondance de l'ARNm des récepteur TP α et TP β** »

Figures III.6 et III.7 A) et B) Axe des ordonnées « Fold repression » **lire** « Fold induction »

p.48 point III.5.4.2. intitulé « **IL-6 et COX-2** »

« Le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} ne semblent pas influencer de manière importante l'abondance de l'ARNm de l'IL-6 (6 et 2 fois) et de COX-2 (3 et 4 fois). » **lire** « Le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} ne semblent pas influencer de manière importante l'abondance de l'ARNm de l'IL-6 (6 et 2 fois) et de COX-2 (3 et 1 fois).

p.54 point IV. intitulé « **Discussion, conclusions et perspectives** »

Supprimer les deux phrases : « Cet effet apparaît cependant excessif, car l'effet des antagonistes devraient donner des niveaux d'induction proches de l'IL-1 β . En effet, l'effet des deux antagonistes sur les cellules stimulées simultanément au 8-*iso*-PGF_{2 α} et à l'IL-1 β permet de retrouver le niveau atteint par l'IL-1 β seule quand on quantifie l'expression de l'ARNm de VCAM-1. »

p.57 point IV. intitulé « **Discussion, conclusions et perspectives** »

« Le SQ29548 et le BM-520 montrent un effet similaire, indiquant que les deux agonistes sont aussi puissants l'un que l'autre. » **lire** « Le SQ29548 et le BM-520 montrent un effet similaire, indiquant que les deux antagonistes sont aussi puissants l'un que l'autre. »

Abréviations

8- <i>iso</i> -PGF _{2α}	8- <i>iso</i> -prostaglandine F _{2α}
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	AMP cyclique
CETP	<i>Cholesterol Ester Transfert Protein</i>
CML	Cellules Musculaires Lisses
COX	Cyclooxygénase
DAG	Diacylglycérol
ELAM-1	<i>Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1</i>
F _{max}	Fluorescence maximale
F _{min}	Fluorescence minimale
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
GPCR	<i>G Protein Coupled Receptor</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HPETE	<i>Hydroperoxyeicosatetranoic</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
HVSMCs	<i>Human Vascular Smooth Muscle Cells</i>
ICAM	<i>Inter Cellular Adhesion Molecule</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IL-1β	Interleukin-1 bêta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
LCAT	<i>Lecitine Cholesterol Acyl Transferase</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
ox-LDL	<i>oxydized Low Density Lipoprotein</i>
LOX	Lipooxygénase
LPL	<i>Lipoproteine Lipase</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	Métalloprotéinases Matricielles
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa binding</i>

NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PGD ₂	Prostaglandine D ₂
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGI ₂	Prostaglandine I ₂ (prostacycline)
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLA ₁	Phospholipase A ₁
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
cPLA ₂	PLA ₂ cytosoliques
cPLA _{2α}	Isoenzyme α de la cPLA ₂
iPLA ₂	PLA ₂ indépendantes du calcium
sPLA ₂	PLA ₂ sécrétoires
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TXA ₂	Thromboxane A ₂
TXB ₂	Thromboxane B ₂
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	1
1. L'ATHÉROSCLÉROSE	1
1. 1. Les lipoprotéines	1
1. 2. Les apoprotéines	2
1. 3. Le métabolisme des lipoprotéines	2
1. 3. 1. Les chylomicrons	3
1. 3. 2. Les VLDL	3
1. 3. 3. Les IDL	3
1. 3. 4. Les LDL	4
1. 3. 5. Les HDL	4
1. 4. Physiopathologie de l'athérosclérose	4
1. 4. 1. Structure d'une artère saine	4
1. 4. 2. Anatomopathologie de la plaque	5
1. 4. 2. 1. La lésion pré-athéromateuse	5
1. 4. 2. 2. Les stries lipidiques	5
1. 4. 2. 3. La plaque athéromateuse simple fibro-lipidique	6
1. 4. 2. 4. La plaque athéromateuse compliquée	6
1. 5. Athérogenèse	7
1. 5. 1. Initiation de la liaison	7
1. 5. 1. 1. Modifications enzymatiques	7
1. 5. 1. 2. Modifications oxydatives	8
1. 5. 2. Recrutement des monocytes	8
1. 5. 3. Les cellules spumeuses	8
1. 5. 4. Migration et prolifération des cellules musculaires lisses	9
1. 5. 5. Formation du noyau nécrotique	9
1. 5. 6. Rupture de la plaque et thrombus	9
2. LES ÉICOSANOÏDES	10
2. 1. Les acides gras précurseurs	10
2. 2. Les phospholipides membranaires	10
2. 3. Libération des acides gras	11
2. 4. Métabolisme de l'acide arachidonique (voie enzymatique)	11
2. 4. 1. La voie des cyclooxygénases	12

3. LES PROSTANOÏDES.....	13
3. 1. Le thromboxane A ₂	13
3. 2. Le récepteur du thromboxane A ₂	14
3. 3. Distribution du récepteur TP	14
3. 4. Transduction du signal	14
3. 5. Les isoformes du récepteur TP	15
3. 6. Oligomérisation du récepteur TP	16
3. 7. Ligands du récepteur TP	17
3. 7. 1. Agonistes du récepteur TP	17
3. 7. 2. Antagonistes du récepteur TP	17
3. 7. 3. Les nouvelles molécules.....	17
4. MÉTABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE (VOIE NON-ENZYMATIQUE).	17
4. 1. Les isoprostanes	17
4. 1. 1. Formation des isoprostanes	17
4. 1. 2. Le 8- <i>iso</i> -PGF _{2α}	18
4. 1. 3. Rôle des isoprostanes dans l'athérosclérose.....	18
5. LA VOIE NF-κB.....	18
5. 1. Voie d'activation classique : la voie canonique	19
5. 2. Le complexe IKK	19
6. OBJECTIF DU MÉMOIRE	21
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
1. CULTURE CELLULAIRE	22
1. 1. Matériel	22
1. 2. Méthode.....	22
2. STIMULATION DES CELLULES	23
2. 1. Molécules utilisées :	23
2. 2. Méthode.....	23
3. DOSAGE DE LA CONCENTRATION EN PROTÉINES PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD.....	23
3. 1. Matériel	24
3. 2. Méthode.....	24

4. EXTRACTION NUCLEAIRE	24
4. 1. Matériel	24
4. 2. Méthode.....	24
5. EXTRACTION PROTEIQUE TOTALE	25
5. 1. Matériel	25
5. 2. Méthode.....	25
6. EXTRACTION TOTALE DE PROTEINES MEMBRANAIRES	25
6. 1. Matériel	25
6. 2. Méthode.....	25
7. MESURE DE LA LIAISON DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION À LEUR SÉQUENCE CONSENSUS PAR DOSAGE COLORIMÉTRIQUE (TEST TRANS- AM).....	25
8. FIXATION D'ADN DOUBLE-BRINS SUR PUIITS	26
8. 1. Matériel	26
8. 2. Méthode.....	26
9. DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE L'ACTIVITÉ DE LIAISON À L'ADN DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	26
9. 1. NF-kB	26
9. 1. 1. Matériel	26
9. 1. 2. Méthode.....	27
9. 1. 2. 1. Liaison du facteur à l'ADN.....	27
9. 1. 2. 2. Fixation de l'anticorps primaire	27
9. 1. 2. 3. Fixation du conjugué anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase	27
9. 1. 2. 4. Révélation	27
9. 2. AP-1.....	27
9. 2. 1. Matériel	27
9. 2. 2. Méthode.....	28
10. IMMUNOFLUORESCENCE	28
10. 1. Matériel	28
10. 2. Méthode.....	28
11. WESTERN BLOT	29
11. 1. Matériel	29

11. 2. Méthode.....	29
11. 2. 1. Préparation des gels.....	29
11. 2. 2. Echantillons et migration	29
11. 2. 3. Transfert des protéines sur une membrane de PVDF.....	30
11. 2. 4. Traitement de la membrane.....	30
11. 2. 5. Révélation.....	30
12. MESURE DE L'EXPRESSION DE GÈNES PAR RT-PCR EN TEMPS RÉEL	31
12. 1. Extraction d'ARN total	31
12. 1. 1. « RNeasy Total RNA Isolation System »	31
12. 1. 1. 1. Matériel.....	31
12. 1. 1. 2. Méthode	31
12. 1. 2. « TRI Reagent Solution »	32
12. 1. 2. 1. Matériel.....	32
12. 1. 2. 2. Méthode	32
12. 2. Reverse transcription (RT)	32
12. 2. 1. Matériel	32
12. 2. 2. Méthode.....	32
12. 3. PCR en temps réel	33
12. 3. 1. Matériel	33
12. 3. 2. Méthode.....	33
13. Dosage de l'expression de MCP-1 par ELISA.....	33
13. 1. Matériel	34
13. 2. Méthode.....	34
13. 2. 1. Récupération du surnageant.....	34
13. 2. 2. Dosage des protéines par la méthode de Folin	34
13. 2. 3. Dosage du MCP-1 sécrété par le kit R&D Systems Quantikine Human CCL2/MCP-1 (Tableau II.10.)	34
14. Test de prolifération cellulaire : le dosage MTT	35
14. 1. Matériel	35
14. 2. Méthode.....	35
15. Effets des agonistes du récepteur TP sur la concentration cytosolique en calcium 	35
15. 1. Matériel	35
15. 2. Méthode.....	36
15. 2. 1. Préparation des cellules	36
15. 2. 2. Mesure de la fluorescence émise suite à la mobilisation du calcium intracellulaire.....	36

III. RÉSULTATS37

1. CARACTÉRISATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES HUMAINES (HVSMCs)37

- 1. 1. Expression de l'isoforme α de l'actine 37
- 1. 2. Expression du récepteur au thromboxane A_2 dans les HVSMCs..... 37
- 1. 3. Mesure de la fluorescence émise lors de la mobilisation cytosolique du calcium 38
 - 1. 3. 1. Effet du U46619 38
 - 1. 3. 2. Effet du 8-*iso*-PGF_{2 α} 38
- 1. 4. Etude de l'effet des modulateurs du récepteur TP sur la prolifération des HVSMCs 39
- 1. 5. Effets des agonistes et des antagonistes sur l'abondance de l'ARNm des récepteurs TP α et TP β 39
 - 1. 5. 1. Incubation de 6 heures..... 40
 - 1. 5. 2. Incubation de 16 heures..... 40

2. ETUDE DES EFFETS DES MODULATEURS DU RÉCEPTEUR TP SUR L'EXPRESSION DE VCAM-1 ET ICAM-141

- 2. 1. Effets des modulateurs du récepteur TP sur l'activation des voies JNK et p38.... 41
 - 2. 1. 1. Effets du U46619 et du 8-*iso*-PGF_{2 α} sur les phosphorylations de JNK et p38 41
 - 2. 1. 1. 1. Effet du U46619 41
 - 2. 1. 1. 2. Effet du 8-*iso*-PGF_{2 α} 41
 - 2. 1. 2. Effets du SQ29548 et du BM-520 sur l'activation des voies de JNK et p3841
- 2. 2. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'activité de AP-1 42
 - 2. 2. 1. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de c-Jun 42
 - 2. 2. 2. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de c-Jun 42
 - 2. 2. 3. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur la localisation de c-Jun 43
 - 2. 2. 4. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 .. 43

3. EFFETS DE L'IL-1 β ET DES MODULATEURS DU RÉCEPTEUR TP SUR LA RÉGULATION DE VCAM-1.....44

- 3. 1. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de VCAM-1 44
 - 3. 1. 1. Incubation de 6 heures..... 44
 - 3. 1. 2. Incubation de 16 heures..... 44

3. 2.	Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur la localisation de VCAM-1	44
4.	EFFETS DE L'IL-1β ET DES MODULATEURS DU RÉCEPTEUR TP SUR L'EXPRESSION D'ICAM-1	45
4. 1.	Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm d'ICAM-1	45
4. 1. 1.	Incubation de 6 heures.....	45
4. 1. 2.	Incubation de 16 heures.....	46
4. 2.	Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur la localisation d'ICAM-1	46
5.	ETUDE DES EFFETS DES MODULATEURS DU RÉCEPTEUR TP SUR LA VOIE NF-κB	46
5. 1.	Effets du U46619 sur la protéine I- κ B α	47
5. 2.	Effets des modulateurs du récepteur TP sur la localisation subcellulaire de NF- κ B	47
5. 3.	Effets des modulateurs du récepteur TP sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B	47
5. 4.	Effets des modulateurs du récepteur TP l'abondance de l'ARNm sur de gènes cibles de NF- κ B.....	48
5. 4. 1.	IL-8.....	48
5. 4. 2.	IL-6 et COX-2	48
5. 4. 3.	MCP-1	48
6.	Evaluation de la sécrétion de la cytokine MCP-1	48
IV.	DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	50
V.	BIBLIOGRAPHIE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I. Introduction

1. L'athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires englobent un vaste ensemble de pathologies et d'organes cibles. Elles représentent, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde. Les facteurs de risque sont multiples, en progression perpétuelle, et leur prise en charge tient aujourd'hui une importance considérable en terme de santé publique.

L'athérosclérose telle que définie par l'OMS est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibres consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de cellules du sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de défaut de la média (OMS, 1954).

Cette maladie peut être considérée comme une forme d'inflammation chronique, résultat de l'interaction entre des lipoprotéines modifiées, des macrophages dérivés des monocytes et des différents éléments de la paroi artérielle. Ce processus inflammatoire peut mener à la formation de lésions complexes, ou plaques, qui vont perturber le diamètre de la lumière du vaisseau. La rupture de la plaque et le risque de thrombose peuvent mener à des complications cliniques aiguës telles que l'infarctus du myocarde ou les accidents vasculaires cérébraux.

Guérir l'athérosclérose n'est actuellement pas possible, mais il existe des traitements qui tentent à maîtriser les nombreux facteurs de risque. Ces derniers ont été identifiés après de multiples études épidémiologiques et peuvent être classés en deux groupes : les facteurs de risque à composante génétique, non-modifiables, (hérédité, sexe, obésité, hypertension artérielle...) et les facteurs de risque environnementaux, liés à des habitudes de vie et modifiables (tabac, manque d'exercice, régime alimentaire,...). Aucun de ces facteurs pris individuellement n'est suffisant pour induire l'apparition de la maladie.

1.1. Les lipoprotéines

Le cholestérol, comme beaucoup de lipides, ne peut circuler sous forme libre dans le plasma en raison de son caractère hydrophobe. Les lipoprotéines sont de petites unités qui facilitent ce déplacement en permettant d'empaqueter les lipides. Elles sont constituées de deux composantes : les lipides à transporter et les protéines qui permettent de maintenir la cohésion du complexe, sa solubilisation dans l'eau et le transport à destination. Le cœur de la lipoprotéine est hydrophobe et est constitué de lipides apolaires et des vitamines liposolubles. La couche extérieure hydrophile est composée majoritairement de protéines amphiphiles : les apoprotéines appelées aussi apolipoprotéines (Figure I.1.). Les lipoprotéines sont classées et nommées en fonction de leur densité. Le contenu en apoprotéines est très important dans cette classification car plus le complexe est chargé en apoprotéines, plus la densité sera haute. La taille des lipoprotéines est inversement proportionnelle à la densité. Les lipoprotéines de plus faible densité sont les chylomicrons. Les *very low density lipoprotein* (VLDL), les *low density lipoprotein* (LDL) et les *high density lipoprotein* (HDL) sont des lipoprotéines respectivement de plus en plus denses.

1. 2. Les apoprotéines

Les apoprotéines sont des constituants importants des lipoprotéines. Outre leur rôle structural, les apoprotéines sont capables d'agir comme cofacteur pour certaines enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique et, d'autre part, comme ligand pour des récepteurs aux lipoprotéines. Une grande partie des apoprotéines ont une structure composée d'une hélice amphiphile. Elles présentent en surface, côté plasmatique, les acides aminés à chaîne latérale hydrophile, tandis que des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe sont dirigés vers le cœur de la particule. Les apoprotéines sont formées principalement dans le foie mais l'intestin est également un lieu de formation.

Les principales classes d'apoprotéines sont :

- **Apoprotéine A-I** : L'apoprotéine A-I ou Apo A-I est le constituant principal des HDL, elle est synthétisée par la muqueuse de l'intestin grêle et est incorporée dans les chylomicrons. Plus tard, elle sera incorporée dans les HDL à partir de ces mêmes chylomicrons. L'Apo A-I agit comme cofacteur nécessaire à l'activité de la *lecithine cholesterol acyl transferase* (LCAT), responsable de l'estérification du cholestérol, permettant une mise en réserve de celui-ci.
- **Apoprotéine B** : Deux formes, issues de la transcription d'un même gène, existent pour l'apoprotéine B:
 - **L'ApoB₄₈**, constituant des chylomicrons et synthétisée dans la muqueuse intestinale. L'ARNm de l'apoprotéine B est modifié après la transcription du gène correspondant et un codon stop est placé après 48% de la séquence.
 - **L'ApoB₁₀₀**, constituant des VLDL et des LDL, est synthétisée dans le foie.
- **Apoprotéine C-II** : L'apoprotéine C-II est un constituant des chylomicrons, des VLDL et des HDL. En tant que cofacteur, elle participe à l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL). Cette dernière hydrolyse les triglycérides des chylomicrons et des VLDL.
- **Apoprotéine E** : L'apoprotéine E est un autre constituant des chylomicrons, des VLDL et des HDL, elle se lie à son récepteur dans le foie et permet à la cellule hépatique de capturer et d'« endocyter » ces lipoprotéines.

1. 3. Le métabolisme des lipoprotéines

Le rôle principal des lipoprotéines est le transport des lipides d'un endroit à l'autre de l'organisme. Le métabolisme des lipoprotéines contient une voie exogène, une voie endogène et une voie reverse du transport du cholestérol (Figure I.2.).

La voie exogène comprend le transport des lipides alimentaires, principalement constitués de triglycérides et absorbés lors de la digestion. Ces lipides se retrouvent empaquetés sous forme de chylomicrons et sont transportés vers les tissus périphériques. Les restes (« *remnants* ») des chylomicrons sont acheminés vers le foie.

La voie endogène implique le transport des lipides synthétisés par le foie vers les tissus périphériques. Ce transport est assuré par les VLDL, mais aussi par les produits de leur transformation, les IDL et les LDL.

La voie reverse du cholestérol ramène le cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie. Ce transport est assuré par les HDL.

Il existe des interactions entre la voie endogène et la voie reverse. En effet, des échanges d'apoprotéines et de lipides ont lieu entre les lipoprotéines circulantes grâce à la LCAT et à la *cholesterol ester transfert protein* (CETP).

1. 3. 1. Les chylomicrons

Les lipides alimentaires sont absorbés par les entérocytes dans l'intestin. Les chylomicrons sont formés durant la période post-prandiale dans le réticulum endoplasmique lisse à partir de triglycérides, et sont associés à l'apoprotéine B₄₈. Les chylomicrons sont ensuite libérés dans le système lymphatique avant de rejoindre la circulation veineuse. Une fois dans le sang, ils vont recevoir des HDL les apoprotéines C-II et E.

L'ApoC-II est le cofacteur de la lipoprotéine lipase (LPL), située en surface de l'endothélium des capillaires sanguins des organes cibles. La LPL est responsable de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol. Les acides gras seront capturés par les cellules à proximité, et le glycérol sera transporté vers le foie.

Les chylomicrons qui ont cédé une grande partie de leurs triglycérides sont appelés les « restes des chylomicrons » ou « remnants ». Ils sont formés de cholestérol, d'esters de cholestérol et des Apo B₄₈ et E. Les récepteurs hépatiques LRP sont spécifiques des Apo E. Ils permettent l'endocytose du cholestérol et des triglycérides alimentaires par les hépatocytes.

1. 3. 2. Les VLDL

Les acides gras sont synthétisés par le foie pour former des triglycérides. Ceux-ci forment des complexes appelés VLDL et sont expédiés vers la périphérie. Ils sont caractérisés par une très basse densité et donc une forte proportion de lipides. L'ApoB₁₀₀ permet de stabiliser la structure des VLDL. Une fois dans le sang, des échanges ont lieu entre les VLDL et les HDL, apportant des ApoE et des ApoC-II aux VLDL. L'action de l'ApoC-II va être la même que pour les chylomicrons, et les triglycérides vont être clivés. Les VLDL appauvris en triglycérides vont désormais former des *intermediate density lipoproteins* (IDL)

1. 3. 3. Les IDL

Ces lipoprotéines ont conservé leur cholestérol, mais ont cédé leurs triglycérides, ce qui leur donne un pourcentage de cholestérol plus important que les VLDL. Les IDL contiennent de l'ApoB₁₀₀ en majorité, car une grande partie des ApoE et Apo C-II ont été perdues. Les IDL vont servir de précurseurs à la formation par le foie de complexes de plus haute densité : les LDL.

1. 3. 4. Les LDL

Les LDL sont composées majoritairement d'esters de cholestérol et presque qu'exclusivement d'ApoB₁₀₀. Les LDL cèdent leur cholestérol aux tissus périphériques et au foie selon un rapport 1/3-2/3. Cet échange est possible grâce aux récepteurs aux LDL qui sont en fait des récepteurs à l'ApoB₁₀₀. Etant donné que les LDL cèdent leur cholestérol aux tissus périphériques, elles sont généralement qualifiées de « mauvais cholestérol ».

1. 3. 5. Les HDL

Les HDL sont formées dans le foie et l'intestin et sont libérées dans la circulation sanguine. Elles contiennent principalement l'ApoA-I, capable de se fixer à la LCAT synthétisée par le foie. Cette dernière estérifie le cholestérol avec un acide gras. Le cholestérol va ainsi s'accumuler progressivement au cœur des HDL. La périphérie du complexe va s'enrichir en phospholipides, en apoprotéines C-II et E mais aussi en cholestérol libre provenant de la dégradation des VLDL et des chylomicrons dans les tissus périphériques. Les HDL seront finalement captées par le foie et y seront dégradées. Contrairement aux LDL, les HDL sont qualifiées de « bon cholestérol ».

1. 4. Physiopathologie de l'athérosclérose

Le terme « athérome », caractérisant la pathologie athéromateuse vient du grec « ather », qui signifie « bouillie ». Le nom « athérosclérose » a été donné bien plus tard et fait référence aux deux composants qui le constituent : l'athérome (ou cœur lipidique) et sclérose (ou anneau fibreux). L'athérosclérose est actuellement définie comme une association variable de remaniements de l'intima de certaines artères, par accumulation focale de lipides, de glucides, de cellules du sang, de tissus fibreux et de dépôts calciques.

Cette pathologie est définie comme une inflammation chronique des artères de moyen et de gros calibre. Les artères les plus touchées sont l'aorte, les artères coronaires, les artères cérébrales et les artères des membres inférieurs. L'origine de cette maladie repose sur des interactions complexes entre des composants plasmatiques athérogènes (lipoprotéines par exemple) et les cellules de la paroi vasculaire (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, macrophages,...). La présence de plaques athéromateuses au sein des artères peut être à l'origine d'affections aiguës comme les cardiomyopathies ischémiques, les accidents vasculaires cérébraux et l'ischémie des membres inférieurs.

1. 4. 1. Structure d'une artère saine

Le système artériel assure le transport du sang oxygéné vers les différents tissus de l'organisme. Ce système est très étendu et se termine par des réseaux de fins capillaires qui constituent les principaux sites d'échanges de métabolites et de gaz entre le sang et les tissus.

Les artères possèdent toutes une structure commune composée de trois couches distinctes (Figure I.3.).

L'**intima** est la couche la plus interne. Elle est recouverte d'une monocouche de cellules épithéliales aplaties et jointives, appelées cellules endothéliales. Ensemble, elles forment l'endothélium. Ces cellules reposent sur une lame basale, sous laquelle on retrouve

généralement une mince couche de fibres de collagène et des fibres élastiques. L'endothélium possède de nombreuses fonctions, dont la plus importante est de former une barrière physique mais perméable entre le sang et les tissus. Il possède à la fois des fonctions sensibles et exécutives. Il peut générer des molécules effectrices qui ont la capacité de réguler le tonus du muscle lisse vasculaire, l'environnement thrombotique, la réponse inflammatoire mais aussi le remodelage vasculaire.

La **média** est la couche moyenne de la paroi vasculaire séparée de l'intima par la lame élastique interne. Elle est constituée majoritairement de cellules musculaires lisses. Celles-ci sont fusiformes et dotées d'un cytosquelette contractile. Le muscle lisse est renforcé par des couches organisées de fibres élastiques, dont la quantité varie en fonction du type d'artère. La caractéristique principale des artères de type musculaire (artères coronaires, fémorales,...) est la faible quantité de fibres élastiques que l'on y retrouve, contrairement aux artères élastiques (aorte, artères iliaques,...) où l'abondance des fibres élastiques est importante. La média est séparée de l'adventice par la lame élastique externe.

L'**adventice** est la couche la plus externe. Elle est composée majoritairement de tissu conjonctif et de tissu adipeux. Dans les artères à paroi épaisse, l'adventice renferme de petits vaisseaux, les *vasa vasorum*, dont le rôle est l'irrigation de la paroi. On y retrouve également des vaisseaux lymphatiques et des terminaisons nerveuses (*vasa nervorum*).

1. 4. 2. Anatomopathologie de la plaque

La plaque d'athérosclérose suit une métamorphose lente et progressive de l'intima artériel. La genèse de la plaque peut se diviser en différentes étapes décrites ci-dessous (Figure I.4.).

1. 4. 2. 1. La lésion pré-athéromateuse

La lésion initiale est constituée d'une accumulation sous-endothéliale de macrophages gorgés de lipides (cellules spumeuses) dans l'intima. Ce dépôt commence dès les premières années de la vie. Il existe également un début de prolifération des cellules musculaires lisses mais ces modifications n'ont, à ce stade, aucune conséquence sur la morphologie de la lumière vasculaire. En effet, un remodelage adaptatif du vaisseau a lieu en réponse à l'athérosclérose : le diamètre externe du vaisseau augmente de façon à conserver un calibre luminal normal.

1. 4. 2. 2. Les stries lipidiques

Les stries lipidiques se présentent comme des traînées jaunâtres déformant légèrement la paroi artérielle. Elles peuvent être visibles au niveau de l'aorte chez les jeunes enfants mais aussi au niveau des artères coronaires à partir de l'âge de dix ans. Leur localisation se fait uniquement dans l'intima. Elles sont composées de cellules musculaires lisses et de cellules spumeuses. Ces dernières sont issues des macrophages de l'intima qui se sont chargés en lipides.

Les sites de prédilection de la formation des stries lipidiques sont le plus souvent les zones où le flux sanguin est turbulent. Considérées comme les précurseurs de la plaque athéromateuse, elles peuvent évoluer vers le stade suivant ou tout simplement régresser. Cette évolution dépend en grande partie des forces hémodynamiques et du taux plasmatique en lipoprotéines athérogènes.

1. 4. 2. 3. La plaque athéromateuse simple fibro-lipidique

La plaque simple est une élévation régulière de couleur blanche ou jaune clair, qui fait saillie dans la lumière artérielle. C'est un épaississement intimal recouvert par une couche endothéliale intacte. Sa taille varie autour de 2 cm de diamètre. Cet épaississement est constitué de deux parties : une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses, de matrice extracellulaire et de fibres de collagènes et un centre nécrotique riche en macrophages et en lipides, libérés après dégénérescence des cellules spumeuses.

La formation de cette plaque athéroscléreuse entraîne d'autres modifications de la paroi artérielle environnante. La formation de néo-vaisseaux provenant de ramifications des *vasa vasorum* permet une augmentation de l'irrigation de la paroi. La structure de la paroi est également modifiée : le développement de la plaque entraîne une fragmentation de la limitante élastique interne et un amincissement de la média. Au niveau de l'adventice, on retrouve des cellules lymphocytaires et des granulomes, signes du caractère inflammatoire de la pathologie.

1. 4. 2. 4. La plaque athéromateuse compliquée

Le processus de formation de la plaque peut se poursuivre et s'étendre longitudinalement puis sur toute la circonférence du vaisseau. A ce stade, les plaques peuvent devenir extrêmement complexes et un certain nombre de complications peuvent survenir et rendre ainsi les lésions symptomatiques.

La calcification est une modification qui touche presque toujours les plaques d'athérosclérose. Son origine provient de la précipitation des ions Ca^{2+} sur la matrice extracellulaire. La calcification durcit la lésion et la rend instable. Elle peut être localisée ou plus massive. Elle augmente aussi les risques de rupture de la plaque.

L'ulcération se distingue par une érosion de la couche endothéliale qui va mettre en interaction le sang circulant et les constituants de la plaque. Ce contact va stimuler la formation plus ou moins importante d'un thrombus. Les plaquettes sont mobilisées vers le sous-endothélium et libèrent des substances vasoconstrictrices. L'ulcération peut également être la source d'embolies lors de la libération de matériel athéromateux ou de cristaux de cholestérol dans la circulation.

La sténose est un rétrécissement de la lumière artérielle provoqué par la saillie de la plaque. La sténose peut être déclenchée par une plaque seule ou par une plaque à laquelle s'est ajouté un thrombus.

Les hémorragies peuvent être dues à la rupture de *vasa vasorum* irriguant la paroi artérielle ou à la pénétration du sang venant de la lumière artérielle après une ulcération.

La thrombose provient de la formation d'un thrombus qui obstrue la lumière du vaisseau sanguin. Le thrombus est le produit final de l'agrégation plaquettaire. La conséquence d'une thrombose est une occlusion entraînant une ischémie des tissus en aval et finalement la nécrose de ces tissus. Un thrombus peut s'intégrer au sein d'une plaque athéromateuse, augmentant ainsi sa taille et diminuant la lumière du vaisseau sanguin. Mais, il peut également se former brutalement et obstruer la lumière artérielle, provoquant un infarctus. Cet événement est généralement

rencontré lorsque la plaque est instable. Le thrombus peut finalement se détacher de la plaque être emporté dans la circulation avec pour conséquence une thromboembolie.

1. 5. Athérogenèse

L'endothélium joue un rôle clé dans l'initiation et la progression de la plaque d'athérosclérose. Très rapidement dans le processus d'athérogenèse, ses fonctions vont être altérées, sans que des lésions artérielles ne soient cliniquement détectables.

1. 5. 1. Initiation de la liaison

La lésion athéromateuse est un processus lent et progressif. Le « shear stress » est la force physique influençant le plus la morphologie des cellules endothéliales. Les cellules situées dans les régions tubulaires des artères, là où le flux est uniforme et laminaire, sont allongées et alignées dans la direction du flux. Dans les portions d'artères courbées ou dans un embranchement, le flux est perturbé et les cellules endothéliales n'ont pas d'orientation particulière. Ces régions montrent une perméabilité accrue aux macromolécules telles que les LDL et représentent donc des sites préférentiels pour la formation de lésions (Gimbrone, 1999).

Les LDL vont donc s'infiltrer entre les cellules endothéliales et, une fois dans l'intima, vont pouvoir suivre différentes voies :

- retourner dans le plasma
- se diriger vers la média
- être retenues dans l'intima par des interactions avec la matrice extracellulaire
- se faire capter par des macrophages

L'accumulation des LDL dans l'espace sous-endothélial est en relation étroite avec l'augmentation de la concentration plasmatique de LDL. Cette accumulation va entraîner un déséquilibre entre les différentes voies, qui peut également être dû à un dysfonctionnement endothélial. Les LDL vont diffuser passivement à travers l'endothélium et interagir avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Les charges positives des résidus de leur ApoB₁₀₀ s'associant aux charges négatives des glycoaminoglycanes (Figure I.5.).

Les lipoprotéines séquestrées vont subir des modifications progressives, entraînant une réponse inflammatoire localisée. Les interactions des LDL avec la matrice extracellulaire vont induire des altérations irréversibles au niveau de la structure des LDL. Celles-ci vont subir des processus d'oxydation, de lipolyse, de protéolyse et d'agrégation. Ces modifications vont contribuer à l'apparition de l'inflammation mais aussi à la formation de cellules spumeuses.

1. 5. 1. 1. Modifications enzymatiques

Deux enzymes peuvent agir sur les LDL : la phospholipase A₂ (PLA₂) et la sphingomyélinase. La première est sécrétée par les cellules de l'intima et permet la

formation de lysophosphatidylcholines ayant des effets potentiellement pro-athérogéniques. La seconde mène à la formation de LDL agrégées, reconnues par les macrophages et induisant leur transformation en cellules spumeuses.

1. 5. 1. 2. Modifications oxydatives

Les LDL, privées d'anti-oxydants dans l'intima, vont subir un processus d'oxydation menant à la formation d'ox-LDL. Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ou encore les macrophages peuvent oxyder les LDL. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qu'elles vont produire vont s'attaquer aux acides gras polyinsaturés, plus vulnérables du fait de leur double liaison. Ces modifications vont, dans un premier temps, donner naissance aux « minimally oxidized LDL ». Ces complexes ont une activité inflammatoire mais ne sont pas reconnus par les récepteurs scavengers. La portion protéique (ApoB₁₀₀) va ensuite être affectée, menant à une perte de reconnaissance par le récepteur au LDL mais lui permettant désormais d'être reconnue par le récepteur scavenger (Figures I.6.). Les produits de toutes ces modifications sont les ox-LDL, complexes cytotoxiques responsables de la formation des cellules spumeuses.

1. 5. 2. Recrutement des monocytes

Le recrutement des monocytes et des lymphocytes T dans la paroi vasculaire est une des premières étapes de la formation des stries lipidiques qui va contribuer à la progression de la plaque tout au long du processus athéromateux. L'événement déclencheur est l'accumulation de minimally oxidized LDL, qui va être à l'origine de l'activation endothéliale.

L'endothélium activé va produire des molécules pro-inflammatoires, comprenant des molécules d'adhérence, des facteurs de croissance et des chimiokines (Fan & Watanabe, 2003). Les LDL oxydées peuvent par ailleurs inhiber la production de monoxyde d'azote (NO), agissant entre autre sur la vasorelaxation.

Parmi les molécules d'adhérence cellulaire, on retrouve la *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) et la *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1). Ces molécules vont se lier spécifiquement aux récepteurs de la cellule inflammatoire telle que l'intégrine VLA-4. Les monocytes vont ainsi adhérer à l'endothélium et commencer le processus de diapédèse. L'attraction des monocytes vers l'intima est renforcée par l'action de molécules chémoattractives (chimiokines) telle que la *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1). La cytokine *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) va permettre la différenciation des monocytes en macrophages, leur prolifération et l'expression des récepteurs scavengers en surface (Figures I.6.).

1. 5. 3. Les cellules spumeuses

Bien que le recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages apparaît comme une fonction protectrice en enlevant les ox-LDL cytotoxiques et pro-inflammatoires, l'accumulation progressive des macrophages et de leur contenu en ox-LDL mène au développement de la lésion. L'expression des récepteurs *scavengers* va permettre l'internalisation d'une quantité importante de ox-LDL. Etant donné qu'il n'existe pas de régulation rétronégative de ces récepteurs, les macrophages vont se gorger de cholestérol et se transformer en cellules spumeuses. La dégradation des ox-LDL au sein de

ces cellules est très limitée, ce qui va finalement aboutir à la mort de cellule et à la libération de son contenu lipidique dans l'intima.

1. 5. 4. Migration et prolifération des cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses vont migrer de la média et proliférer dans l'intima, augmentant la taille de la lésion et participant également à la formation de la chape fibreuse. Elles vont former une capsule autour du centre lipidique constituée de cellules spumeuses. De multiples facteurs de croissance et cytokines contrôlent ce phénomène de migration et de prolifération. Les plus importants sont le *platelet derived growth factor* (PDGF), l'*interleukin-1 bêta* (l'IL-1 β), l'*interleukin-6* (l'IL-6) et le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). Ces molécules sont sécrétées par les macrophages, par les cellules spumeuses mais aussi par les cellules musculaires lisses elles-mêmes. Il existe un équilibre entre la synthèse d'éléments de la matrice synthétisés majoritairement par les cellules musculaires lisses et leur dégradation par les métalloprotéinases matricielles (MMP) synthétisées par l'ensemble des cellules activées de la plaque.

1. 5. 5. Formation du noyau nécrotique

La mort et l'accumulation des cellules spumeuses dans la région centrale de la lésion conduit à la formation d'un noyau lipidique recouvert d'une chape fibreuse. En effet, les ox-LDL sont cytotoxiques pour un grand nombre de cellules comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages,... Une accumulation de lipides, de débris cellulaires et de cristaux de cholestérol sera donc retrouvée au sein du noyau nécrotique et, en périphérie de la lésion, la sécrétion d'une matrice extracellulaire fibreuse.

1. 5. 6. Rupture de la plaque et thrombus

La rupture de plaque et le développement d'un thrombus peuvent avoir lieu à la suite de contraintes mécaniques (flux sanguin) ou d'une composition de la plaque qui la rend très vulnérable. Ces plaques dites « vulnérables » ont une cape fibreuse assez mince, un grand nombre de cellules inflammatoires présentes et un noyau lipidique important. Une plaque peut devenir instable lorsqu'un déséquilibre apparaît entre synthèse et dégradation de la matrice. Ce déséquilibre va dans le sens d'une augmentation de la dégradation, liée à une augmentation de la sécrétion de MMP, et une diminution de la synthèse d'éléments fibreux par les cellules musculaires lisses. Les lymphocytes T participent également au déséquilibre par la libération de l'interféron- γ , inhibiteur de la sécrétion de matrice par les cellules musculaires lisses. Les macrophages vont eux sécréter des protéases qui vont dégrader à leur tour la matrice (Lusis, 2000).

La rupture intervient le plus souvent dans les régions charnières de la lésion. Elle va être responsable de la perte de l'intégrité de l'endothélium, exposant les constituants sous-endothéliaux aux cellules circulantes du sang. Les cellules endothéliales vont également sécréter des facteurs favorisant l'activation plaquettaire tel que le *facteur d'activation des plaquettes* (PAF) (pro-agrégant).

Le thrombus est l'étape finale des plaques d'athéromes. Il peut s'intégrer au sein de la plaque athéromateuse, augmentant sa taille et diminuant ainsi la lumière du vaisseau

sanguin. Cette diminution de la lumière du vaisseau peut causer un syndrome coronaire aigu ou encore un infarctus du myocarde. Si la plaque ne se rompt pas et que la lésion continue à s'étendre, la lumière peut être complètement obstruée, ce qui va engendrer une maladie obstructive. Il est également possible que le thrombus se détache de la plaque et soit emporté dans la circulation, augmentant considérablement le risque d'embolie.

2. Les éicosanoïdes

Les « éicosanoïdes » (du grec « eikosi » qui signifie « vingt ») sont des médiateurs lipidiques biologiquement actifs dérivés d'acides gras insaturés à vingt atomes de carbone. On retrouve dans cette grande famille les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes et les lipoxines. D'un point de vue physiologique, ces molécules sont considérées comme des hormones locales exerçant leurs actions en se liant à des récepteurs spécifiques, couplés à des protéines G. De nombreux stimuli de nature hormonale, chimique ou physique peuvent déclencher la synthèse des éicosanoïdes.

2.1. Les acides gras précurseurs

Les éicosanoïdes sont plus précisément dérivés d'acides gras essentiels polyinsaturés provenant de l'alimentation. Il existe trois groupes d'éicosanoïdes synthétisés principalement à partir de trois acides gras précurseurs : l'acide eicosatriénoate (ou dihomog γ -linoléate), l'acide eicosatétraénoate (ou arachidonate) et l'acide eicosapentaénoate. Ces acides gras possèdent chacun vingt atomes de carbone, mais le nombre et la position des doubles liaisons diffèrent entre eux. Chaque groupe d'éicosanoïdes formé comprend des prostaglandines, des thromboxanes et des leucotriènes et d'autres dérivés des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs).

2.2. Les phospholipides membranaires

Après l'ingestion d'aliments, les acides gras essentiels sont stockés sous forme de glycérophospholipides dans les membranes cellulaires. Ces molécules sont dites amphipathiques, car elles possèdent à la fois un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe. Les carbones 1 et 2 du glycérol sont liés par une liaison ester à des acides gras, et forment la partie hydrophobe. Le troisième carbone du glycérol, qui forme la tête hydrophile, est lui substitué par une phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine ou un phosphatidylinositol. La nature hydrophobe des molécules lipidiques est à la base de la fonction de barrière des membranes cellulaires. Ces glycérophospholipides s'organisent en bicouche : les groupes polaires sont exposés à la surface des membranes et les parties hydrophobes sont situées à l'intérieur de la bicouche. Cette barrière ne permet pas le passage de molécules polaires.

L'acide arachidonique (ou acide 5, 8, 11, 14-eicosatétraénoïque) est formé à partir d'acide gras essentiels à 18 atomes de carbone et provenant de l'alimentation. Les cellules animales contiennent énormément d'acide arachidonique dans leurs membranes, ce qui en fait le substrat principal pour la synthèse d'éicosanoïdes.

2. 3. Libération des acides gras

Les acides gras précurseurs ne sont pas libres, mais estérifiés au niveau des glycérophospholipides. La libération de l'acide gras de la molécule de glycérol se fait donc par l'hydrolyse du lien ester. Cette étape est réalisée par l'action d'enzymes spécifiques appelées phospholipases. Il existe plusieurs types de phospholipases ayant chacune une action sur un carbone spécifique (Figure I.7.) :

- La phospholipase A₁ (PLA₁) permet la libération d'acides gras attachés en C1.
- La phospholipase A₂ (PLA₂) catalyse la libération d'acides gras attachés en C2.
- La phospholipase C (PLC), qui hydrolyse un type spécifique de phospholipide (le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)) en deux messagers secondaires intracellulaires : du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). Le IP₃ permettra la libération de Ca²⁺ à partir du réticulum endoplasmique et le DAG l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Figure I.8.) (Ochocka & Pawelczyk, 2003).
- La phospholipase D (PLD) permet la libération des molécules attachées en C3 (choline, inositol, éthanamine ou sérine)

Etant donné que l'acide arachidonique est l'acide gras que l'on retrouve le plus souvent estérifié en position 2 du glycérol chez l'homme, les phospholipases A₂ sont largement impliquées dans la synthèse des eicosanoïdes. L'action combinée de la phospholipase C et de la diacylglycérol lipase (qui libère les acides gras) peut également être à l'origine de la libération de l'acide arachidonique.

Il existe aujourd'hui près de vingt PLA₂ identifiées chez les mammifères, ayant chacune une fonction cellulaire distincte. Elles appartiennent à différentes familles, parmi lesquelles on retrouve les PLA₂ sécrétoires (sPLA₂), les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) et les PLA₂ indépendantes du calcium (iPLA₂) (Kudo, 2004). L'isoenzyme α de la cPLA₂ (cPLA₂ α) est la seule PLA₂ qui montre une préférence pour l'acide arachidonique parmi tous les acides gras. Cette enzyme cytosolique est dépendante de la concentration en Ca²⁺ et de phosphorylations pour son activation et sa translocation vers la membrane du réticulum endoplasmique (Hirabayashi & Shimizu, 2000). La libération de l'acide arachidonique va permettre à celui-ci d'entrer dans les différentes voies métaboliques.

2. 4. Métabolisme de l'acide arachidonique (voie enzymatique)

Le métabolisme de l'acide arachidonique fait intervenir trois voies métaboliques différentes : la voie des cyclooxygénases (COX), des lipoxygénases (LOX) et des époxygénases. Ces différentes voies sont en compétition pour ce substrat. La première voie permet la production des prostaglandines D₂ (PGD₂), E₂ (PGE₂), F_{2 α} (PGF_{2 α}), de la prostacycline (PGI₂) et du thromboxane A₂ (TXA₂) (Bergstroem *et al.*, 1964; Hamberg & Samuelsson, 1967; Hamberg *et al.*, 1975). La deuxième voie permet quant à elle de former des leucotriènes (Murphy *al.*, 1979), hépoxylines et lipoxines (Serhan, Hamberg *et al.*,

1984). La dernière voie va générer des époxydes (Fitzpatrick & Murphy, 1988) (Figure I.9.).

La voie des cyclooxygénases est particulièrement intéressante dans le cadre de l'athérosclérose. En effet, le métabolisme de l'acide arachidonique par cette voie produit une famille de molécules appelée prostanoïdes, qui comprend notamment le thromboxane A_2 . Ce dernier joue un rôle important dans l'évolution de la plaque athéromateuse, en favorisant en autres l'agrégation plaquettaire et la constriction des muscles lisses vasculaires.

2. 4. 1. La voie des cyclooxygénases

Les COX, encore appelées prostaglandines endoperoxyde H synthétases, sont des enzymes qui catalysent la production de PGs, TXA_2 et PGI_2 . C'est en 1964 que la première COX fut décrite (Bergstroem, Danielsson *et al.*, 1964). Jusqu'en 1990, on pensait qu'il n'existait qu'un seul type de cette enzyme, mais Fu et son équipe ont découvert cette année-là un autre type de COX (Fu, Masferrer *et al.*, 1990), menant à la distinction entre COX-1 and COX-2. Ces deux isoformes sont encodées par deux gènes différents. Une troisième isoforme de COX (COX-3) a été détectée dans des tissus canins mais actuellement sa fonction reste inconnue. C'est un variant d'épissage de COX-1 qui ne possède pas l'intron 1 et qui a subi un décalage du cadre de lecture. COX-1 possède une expression constitutive dans la plupart des tissus. Au contraire, l'expression de COX-2 est induite par différents stimuli tels que l'IL- 1β et le TNF- α . On la retrouve surexprimée principalement au niveau des sites inflammatoires et dans certains cancers (colon, foie, pancreas...). Il a été récemment démontré que son expression est également constitutive dans certains tissus tels que le rein, l'endothélium vasculaire, ou encore le cortex.

La synthèse des prostanoïdes implique la consommation de deux molécules d'oxygène catalysées par la cyclooxygénase, qui possède deux activités enzymatiques séparées : la cyclooxygénase et la peroxydase. L'oxydation de l'acide arachidonique se déroule donc en deux étapes. Premièrement, la COX va catalyser l'oxydation et la cyclisation de l'acide arachidonique pour former de l'endoperoxyde G_2 (PGG_2). Cet endoperoxyde instable va rapidement être converti par l'activité endoperoxydase de la COX en prostaglandine H_2 (PGH_2). Cette dernière est le substrat commun de diverses enzymes spécifiques qui permettront d'obtenir différents prostanoïdes (PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 et TXA_2) (Figure I.10.).

La cyclooxygénase est une « enzyme suicide », c'est-à-dire qu'elle est capable d'autodestruction. Cette caractéristique permet l'interruption de la formation des prostaglandines. Une fois formées, ces dernières sont rapidement inactivées. La cause principale pourrait être la présence de la 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase dans la plupart des tissus.

La synthèse des prostaglandines et thromboxanes ne se fait pas de façon identique dans tous les tissus. Si la plupart des cellules sont capables de synthétiser la PGG_2 et la PGH_2 , la transformation de cette dernière est fonction des différentes synthétases, réductases et isomérases présentes dans la cellule. A titre d'exemple, on retrouve majoritairement des thromboxanes dans les plaquettes sanguines, macrophages et monocytes, alors que les prostaglandines et la prostacycline prédominent dans l'endothélium vasculaire.

3. Les prostanoïdes

Les prostaglandines et thromboxanes sont regroupés sous le nom de « prostanoïdes ». Ces différentes molécules ont une structure commune : ce sont des molécules à vingt atomes de carbone comprenant un cyclopentane et deux chaînes hydrocarbonées.

Malgré cette similarité, leurs actions sont cependant très différentes. Ils agissent via l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. (autocrine et paracrine). Les prostanoïdes exercent leurs actions à proximité de leur site de production, d'où leur dénomination « d'hormones locales ». Elles sont en effet instables et rapidement dégradées. Les prostanoïdes dérivés de l'acide arachidonique jouent des rôles importants, tant aux niveaux physiologique que physiopathologique.

La **prostaglandine D₂** (PGD₂) est le produit de la PGD₂ synthétase. Elle est produite majoritairement dans les mastocytes et est capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire, la croissance cellulaire et est vasodilatatrice.

La **prostaglandine E₂** (PGE₂) est le produit de la PGE₂ synthétase. Elle joue un rôle important dans la régulation de la fonction rénale et dans la facilitation de la reproduction par la provocation de contractions utérines. C'est le produit principal de l'acide arachidonique lors d'une réponse inflammatoire.

La **prostaglandine F_{2α}** (PGF_{2α}) est le produit de la PGF_{2α} synthétase. C'est une substance qui participe à un nombre varié de fonctions au sein de l'organisme. Elle induit la contraction et la relaxation des muscles lisses, la dilatation et la constriction des vaisseaux sanguins et le contrôle de la pression artérielle.

La **prostaglandine I₂** (PGI₂ ou prostacycline) est le produit de la prostacycline synthétase. Elle possède des propriétés vasodilatatrices et anti-agrégantes plaquettaires. Elle est synthétisée principalement par les cellules endothéliales.

Le **thromboxane A₂** (TXA₂) est le produit de la thromboxane synthétase. Il est produit par les plaquettes et possède des propriétés vasoconstrictrices et pro-agrégante plaquettaires. Le TXA₂ et la PGI₂ ont des effets physiologiquement opposés.

3.1. Le thromboxane A₂

Le TXA₂ est un métabolite de l'acide arachidonique avec une demi-vie de l'ordre de 30 secondes. Le TXA₂ est en effet rapidement hydrolysé de manière non-enzymatique en thromboxane B₂ (TXB₂), molécule stable mais biologiquement inactive (Hamberg, 1975). Cette caractéristique explique le fait que le TXA₂ agit à proximité de son site de production, par un système autocrine ou paracrine. Le TXA₂ possède de nombreux effets. La diversité des tissus, organes ou systèmes concernés par son action est très importante. Par conséquent, nous ne citerons que les effets les plus pertinents dans le contexte de notre travail.

- **Les muscles lisses**

Le TXA₂ a été originellement découvert comme une substance capable de contracter l'aorte de lapin (Palmer, 1970). Il possède un puissant pouvoir

contractile sur les cellules lisses vasculaires, mais aussi sur les muscles lisses des bronches, de l'intestin, de l'utérus et de la vessie.

- **Plaquettes**

Il active les plaquettes et permet leur agrégation, influençant positivement la formation d'un thrombus et le phénomène de thrombose.

- **Les cellules endothéliales**

Le TXA₂ accélère l'expression en surface de molécules d'adhérence chez les cellules endothéliales. Il influence ainsi l'expression de ICAM-1), de la VCAM-1 et de l'*endothelial leukocyte adhesion molecule-1* (ELAM-1). Il est impliqué dans l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales.

Le TXA₂ agit également sur le système nerveux central, le système nerveux périphérique, le rein, l'immunité, la prolifération, l'inflammation, l'allergie,...

3. 2. Le récepteur du thromboxane A₂

La liaison du TXA₂ à son récepteur induit un grand nombre d'activités biologiques très diversifiées. Dès lors, de nombreuses études se sont intéressées de plus près aux voies de transduction du signal induites par ce récepteur TP. Le récepteur au thromboxane A₂ appartient à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G hétérotrimériques qui vont activer différentes voies de signalisation une fois le ligand lié.

3. 3. Distribution du récepteur TP

On retrouve les récepteurs TP dans de nombreux tissus et cellules. C'est le cas pour le thymus, la rate, les poumons, les reins, l'utérus, le cœur, le cerveau, le foie, l'estomac, l'intestin, les testicules, le placenta, l'aorte et les plaquettes. Côté cellules, ils sont présents entre autres dans les astrocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

3. 4. Transduction du signal

Les protéines de la super-famille des GPCR ont une architecture commune : sept hélices transmembranaires reliées entre elles par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Les GPCR doivent leur nom à leur haute affinité pour le GTP. Elles sont composées de trois sous-unités : α , β et γ . La sous-unité α possède une activité GTPase et est donc capable d'hydrolyser le GTP lié. Lors de la stimulation du récepteur par un ligand, la sous-unité G_α va échanger un GDP contre un GTP, permettant l'activation du récepteur. Cette activation a lieu jusqu'à ce que le GTP se fasse hydrolyser en GDP, rendant le récepteur à nouveau sensible à une nouvelle stimulation.

Il existe plusieurs sortes de protéines G associées au récepteur TP (Figure I.11.). La plus connue étant la classe des protéines G_α (Nguyen Hwangpo & Iyengar, 2005). Celle-ci peut être sous-divisée en quatre familles.

Les protéines $G_{\alpha q/11}$: les récepteurs TP ont tout d'abord été caractérisés par leur couplage à une protéine G_q hétérotrimérique, première protéine G à avoir été

identifiée comme fonctionnellement associée au récepteur TP. La stimulation de cette famille (comprenant également les sous-unités $G_{\alpha15}$ et $G_{\alpha16}$) entraîne l'activation de la phospholipase C- β , elle-même menant à l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et en DAG. L' IP_3 va se lier ensuite à son récepteur situé dans la membrane du réticulum endoplasmique et provoquer une libération de calcium dans le cytosol. Le DAG va quant à lui rester ancré en membrane et activer la PKC, régulatrice de plusieurs processus intracellulaire (Figure I.11.).

Les protéines $G_{\alpha12/13}$: la stimulation de cette famille active la voie de Rho. Cette voie intervient dans plusieurs événements biologiques, comme la régulation du cytosquelette d'actine, la mobilité cellulaire, la contraction, ou encore la prolifération cellulaire. Le rôle précis de cette famille de protéines G reste néanmoins assez vague, et d'autres voies de signalisation autre que RhoGEF impliquant les protéines de cette famille restent encore à découvrir.

Les protéines G_{ai} : elles inhibent l'adenylate cyclase et induisent une diminution de l'AMP cyclique (AMPc).

Les protéines G_{as} : elles stimulent l'adenylate cyclase et induisent une augmentation de l'AMPc.

L'activation des sous-unités $G_{\beta\gamma}$ joue également un rôle dans la signalisation. Elles permettent l'activation de la phospholipase C- $\beta2$ et des *p44/42 mitogen-activated protein kinase* (p44/42 MAPK)

La protéine G_h , qui n'est pas une protéine G trimérique mais dimérique, possède une activité transglutaminase et active la phospholipase C. Son action est similaire à celle induite par la protéine G_q .

Bien que la liaison du thromboxane A_2 à son récepteur soit, d'un point de vue théorique, capable d'activer toutes les voies de transduction décrites, le type de protéines G couplées au récepteur TP (et par là les voies de transduction induites) dépend du tissu ou du type cellulaire concerné. La majorité des protéines G couplées à ce récepteur reste néanmoins les G_q et G_{13} .

Les voies de transduction du signal ne sont cependant pas exactement les mêmes pour les deux isoformes du récepteur TP (voir ci-dessous). Si elles sont toutes deux couplées à l'activation de la PLC, leurs actions sur l'adénylate cyclase diffèrent : l'isoforme α l'active et l'isoforme β l'inhibe. Les différentes isoformes du récepteur TP, les multiples et complexes voies de transduction du signal possibles et leurs usages préférentiels dans tel ou tel tissu entraîne une diversité importante des réponses biologiques déclenchées lors de la liaison du ligand à son récepteur.

3. 5. Les isoformes du récepteur TP

De nombreuses études ont eu lieu pour tenter de caractériser le récepteur TP. Le clonage du gène du récepteur du TXA_2 en 1991 mis fin à l'hypothèse des éventuels sous-types. Hirata et son équipe ont obtenu un clone d'ADN complémentaire (ADNc) codant pour le récepteur TP de cellules placentaires humaines, mais aussi un clone partiel d'ADNc du récepteur TP à partir de mégacaryocytes humains. Ces deux récepteurs ne présentaient aucune différence du point de vue de leur séquence nucléotidique (Hirata, 1991).

Le gène du récepteur au TXA_2 est localisé sur le chromosome 19p13.3. Il est présent en une seule copie. Il existe deux variants d'épissage du gène humain : le récepteur $\text{TP}\alpha$ et β (Figure I.12.). Le premier, initialement cloné à partir du placenta, contient 343 acides aminés. Il est composé de trois exons et son transcrit contient 2.428 bp. Le second, cloné à partir des cellules endothéliales, est lui composé de 407 acides aminés. Il comprend 4 exons et son transcrit à une longueur de 1.438 bp. Les deux isoformes sont identiques pour leurs 328 premiers acides aminés (côté N-terminal), mais diffèrent quant à leur extrémité C-terminale cytoplasmique. Les sites de liaison au TXA_2 se trouvent du côté extracellulaire et sont identiques pour les deux variants. La différence de fonction entre ces deux isoformes provient donc de leur région C-terminale. Etant donné que les souris et les rats n'ont qu'un seul récepteur TP et que sa séquence est proche du récepteur $\text{TP}\alpha$ humain, sa fonction doit être principale et le récepteur $\text{TP}\beta$ devrait avoir une fonction additive mais ceci reste toujours à démontrer. L'expression membranaire du récepteur $\text{TP}\beta$ est moins importante que celle du récepteur $\text{TP}\alpha$ lorsque les ADNc sont transfectés dans des cellules (Sasaki, 2006). La longue queue C-terminale du récepteur $\text{TP}\beta$ se lie au protéasome, rendant beaucoup plus facile la dégradation du récepteur lors de la traduction.

Bien que les deux isoformes ne varient que par leur extrémité C-terminale, il existe des différences de fonction entre eux. Lorsque les récepteurs TP sont activés par un agoniste tel le IBOP, une augmentation de l'AMPc est observée dans les cellules surexprimant le récepteur $\text{TP}\alpha$, mais une diminution de ce même AMPc dans les cellules surexprimant le récepteur $\text{TP}\beta$. Les récepteurs $\text{TP}\alpha$ seraient donc couplés aux protéines G_s et les récepteurs $\text{TP}\beta$ aux protéines G_i (Hirata, 1996).

3. 6. Oligomérisation du récepteur TP

Jusqu'à ces dernières années, on pensait que les GPCR existaient en fonctionnant de manière individuelle. Cependant, de plus en plus de preuves tendent à appuyer le fait que les GPCR sont capables de former des dimères, voire des oligomères (Terrillon, 2004). Cette caractéristique s'applique aux récepteurs $\text{TP}\alpha$ et $\text{TP}\beta$, capables de former des homo- et des hétéro-dimères (Laroche, 2005; Sasaki, 2006). Il a également été montré que le récepteur $\text{TP}\alpha$ est principalement situé au niveau de la membrane plasmique, tandis que le récepteur $\text{TP}\beta$ se retrouve non seulement dans la membrane plasmique mais aussi dans la cellule.

La dimérisation des récepteurs $\text{TP}\alpha$ et $\text{TP}\beta$ pourrait avoir plusieurs rôles potentiels (Figure I.13.) :

- Un rôle dans la maturation du récepteur en permettant le transport des récepteurs du réticulum endoplasmique vers la surface cellulaire.
- Une fois en membrane, les dimères pourraient être la cible d'une régulation par les ligands.
- Une influence positive ou négative sur l'activation par des ligands.
- La capacité d'augmenter ou atténuer la signalisation ou encore changer le type de protéine G couplée aux récepteurs.
- L'hétérodimérisation pourrait finalement promouvoir la co-internalisation des deux récepteurs après la stimulation de seulement un des deux.

3. 7. Ligands du récepteur TP (Figure I.14.)

3. 7. 1. Agonistes du récepteur TP

Un agoniste est une molécule qui, lorsqu'elle se lie au récepteur, mime l'action du ligand naturel. Comme nous l'avons vu, le TXA₂ est une molécule très instable avec un temps de demi-vie extrêmement court (30 secondes). Son emploi dans des expériences de transduction du signal est dès lors très difficile. Des agonistes synthétiques du TXA₂, beaucoup plus stables, ont donc été créés. Ils constituent des outils pharmacologiques très intéressants. Les deux agonistes les plus utilisés à l'heure actuelle sont le U46619 et le I-BOP.

3. 7. 2. Antagonistes du récepteur TP

Contrairement à l'agoniste, l'antagoniste est une molécule qui, une fois fixée au récepteur, va empêcher l'action du ligand naturel. Plusieurs antagonistes du récepteur TP existent, mais le plus utilisé est de loin le SQ29548. Cette molécule de type prostanoïde est l'antagoniste le plus puissant du récepteur TP (Dogné *et al.*, 2007).

3. 7. 3. Les nouvelles molécules

Le torasémide une sulfonylurée pyridinique, est un diurétique puissant. En 1992, une étude a montré qu'il était capable de relaxer une artère coronaire de chien précontractée par du TXA₂ carbocyclique. Dans le but d'obtenir un antagoniste du récepteur TP plus puissant, de nombreuses molécules apparentées au torasémide ont dès lors été synthétisées. Leurs structures chimiques sont très différentes des antagonistes de référence, mais leurs effets sont similaires. Les BM-573 et BM-520 font partie de ces nouvelles molécules. Ce sont deux isomères qui ont déjà montré des propriétés myorelaxantes sur l'aorte de rat contractée préalablement au U46619 et au 8-*iso*-PGF_{2α} respectivement (Rolin *et al.*, 2007).

4. Métabolisme de l'acide arachidonique (voie non-enzymatique)

L'acide arachidonique peut aussi subir une dégradation non-enzymatique par un mécanisme faisant intervenir des radicaux libres. Les produits de cette dégradation sont des composés actifs appartenant à la famille des isoprostanes (Figure I.15.) (Cracowski *et al.*, 2001).

4. 1. Les isoprostanes

4. 1. 1. Formation des isoprostanes

Les isoprostanes sont une famille d'isomères de prostaglandines, produits de manière non-enzymatique à partir de radicaux libres. La peroxydation lipidique est le mécanisme par lequel les lipides, et notamment l'acide arachidonique, sont attaqués par des radicaux libres. Cette attaque va donner naissance à différents produits oxydés. Dans

un second temps, des endoperoxydes intermédiaires, isomères de la PGH₂, vont être produits. La réduction de ces endoperoxydes peut être soit totale pour générer les isoprostanes de la série F₂, soit partielle, formant dans ce cas les isoprostanes des séries E₂ et D₂.

4. 1. 2. Le 8-*iso*-PGF_{2α} (Figure I.14.)

Les isoprostanes de la série F₂ sont des composés stables présents dans les fluides biologiques et les tissus. Les isoprostanes de la série F₂ peuvent être issus de la peroxydation des phospholipides membranaires ou encore des phospholipides contenus dans les LDL (Figure I.16.) (Patrono & Fitzgerald, 1997). L'isoprostane de la série F₂ le plus étudié est le 8-*iso*-PGF_{2α}. Ce composé est un marqueur de la peroxydation lipidique *in vivo* : il permet d'avoir une idée du niveau du stress oxydatif dans différentes pathologies, parmi lesquelles se trouve l'athérosclérose. En plus d'être un marqueur de l'intensité du stress oxydatif, les isoprostanes sont biologiquement actifs à des concentrations physiologiques.

Le 8-*iso*-PGF_{2α} agit par l'intermédiaire du récepteur TP : les effets de cet isoprostane sont abolis par un antagoniste (SQ29548) du récepteur TP (Kumar *et al.*, 2005). Cependant, l'existence d'un récepteur propre au 8-*iso*-PGF_{2α} n'est pas exclue. Ce récepteur serait distinct, mais proche, du récepteur TP.

Le 8-*iso*-PGF_{2α} est un vasoconstricteur des cellules musculaires lisses, des bronches, du tractus gastro-intestinal et de l'utérus. Il possède également une activité mitogène sur les cellules musculaires lisses (Cracowski *et al.*, 2005).

4. 1. 3. Rôle des isoprostanes dans l'athérosclérose

Le niveau d'isoprostanes augmente dans les plaques athéromateuses par rapport au niveau présent dans les parois artérielles saines. La synthèse des isoprostanes F₂ est stimulée par divers facteurs de risque cardiovasculaires comme le tabagisme, le diabète, l'hypercholestérolémie ou encore l'obésité.

Dans les modèles animaux de l'athérosclérose, la vitamine E, un antioxydant, supprime la peroxydation lipidique *in vivo* et induit une réduction de la progression des lésions athéromateuses. Ces études mettent en avant l'implication des isoprostanes F₂ dans la progression des lésions (Cyrus *et al.*, 2003). Tang *et al.* ont eux montré les effets proathérogéniques du 8-*iso*-PGF_{2α}. Afin de confirmer l'implication du récepteur TP dans ces effets, du 8-*iso*-PGF_{2α} ou du U46619 ont été injectés pendant quatre semaines chez des souris déficientes pour le récepteur TP^{-/-}. Une augmentation de MCP-1 et d'ICAM soluble a été constatée chez les souris TP^{+/+}, mais non chez les souris TP^{-/-} (Tang *et al.*, 2005).

5. La voie NF-κB

L'athérosclérose, comme beaucoup de maladies inflammatoires chroniques, comprend des étapes de production de cytokines et de chimiokines. Le NF-κB est un facteur de transcription important de la réponse inflammatoire. Il est impliqué dans la régulation des gènes inflammatoires et immunitaires, l'apoptose et la prolifération cellulaire. Il est capable de réguler plus de 160 gènes et est activé par un nombre encore

plus grand de facteurs. Beaucoup de ces gènes cibles et facteurs activateurs sont impliqués dans l'athérosclérose. NF- κ B est notamment capable d'activer des cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion.

NF- κ B est un terme est un nom général donné à une famille de facteurs de transcription comprenant p65 (RelA), c-Rel, RelB, NF- κ B 1 (p50 et son précurseur p105), NF- κ B 2 (p52 et son précurseur p100). Toutes ces sous-unités possèdent un domaine conservé du côté N-terminal appelé « Rel homology domain ». Ce domaine permet la dimérisation, l'association avec des protéines inhibitrices ou encore la liaison à l'ADN. Seules les trois premières sous-unités citées contiennent un domaine transactivateur. Les sous-unités sont donc capables de former différents complexes par homo- ou hétérodimérisation.

Le complexe le plus connu et certainement le plus important dans la régulation des fonctions de la paroi vasculaire est le complexe p65/p50, plus connu sous le nom de NF- κ B.

Lorsque la cellule est au repos, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par une protéine inhibitrice de la famille I- κ B, dont la principale représentante est la protéine I- κ B α .

5. 1. Voie d'activation classique : la voie canonique

La voie canonique de NF- κ B peut être activée par divers stimuli extracellulaires, comprenant l'IL-1, le TNF ou encore des composés bactériens et autres produits viraux agissant via différents toll-like receptors (TLR). Ces différents stimuli peuvent activer la cellule à travers leurs récepteurs respectifs, activant différentes cascades de transduction du signal (Figure I.17.). Ces voies de signalisation peuvent mener à l'activation du complexe I- κ B kinase (IKK). Ce complexe activé permet la phosphorylation de I- κ B α , entraînant son ubiquitination par un complexe d'ubiquitine kinase E2 et finalement sa dégradation par le protéasome 26S. La dégradation de I- κ B α mène à l'exposition d'une séquence de translocation nucléaire (NLS) par la molécule dimérique. NF- κ B et donc libre d'effectuer une translocation dans le noyau, et de se lier sélectivement à sa séquence consensus sur l'ADN pour activer des gènes cibles spécifiques. L'ensemble des gènes codant pour des cytokines, chimiokines et autres molécules d'adhérence ne représentent qu'une faible portion des gènes activés par NF- κ B.

5. 2. Le complexe IKK

La phosphorylation de I- κ B par le complexe IKK est une étape essentielle de l'activation par la voie canonique. Le complexe IKK est formé de trois sous-unités : IKK- α (IKK-1), IKK- β (IKK-2) et une sous-unité régulatrice telle que NEMO ou IKK- γ . IKK-2 est connu pour avoir une importante activité kinasique et être principalement impliquée dans la phosphorylation de I- κ B α . L'activation du complexe IKK est médiée par la phosphorylation de IKK-1 ou IKK-2 par des kinases, comprenant des membres de la famille des MAP kinases kinases kinases ou *NF- κ B inducing kinase* (NIK).

NF- κ B est capable d'augmenter l'expression de gènes cibles en association avec d'autres facteurs de transcription. C'est notamment le cas pour VCAM-1, dans l'expression requière l'interaction de NF- κ B avec AP-1. Plusieurs autres gènes

inflammatoires (interleukin-8 (IL-8)), COX-2, MCP-1,...) nécessitent la coopération des ces deux facteurs de transcription.

6. Objectif du mémoire

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique. Elle peut être considérée comme le résultat de nombreuses interactions entre les lipoprotéines modifiées, les macrophages dérivés des monocytes et les différents éléments de la paroi artérielle. Ce processus inflammatoire débouche sur la formation de lésions complexes qui vont perturber le diamètre de la lumière du vaisseau.

L'adhérence des monocytes à la paroi vasculaire constitue une des premières étapes dans le processus d'athérogenèse. Elle est médiée via des molécules d'adhérence exprimées à la surface des monocytes eux-mêmes, mais aussi à la surface des cellules endothéliales et des cellules vasculaires lisses. Bien que de nombreux travaux étudient ce phénomène sur des cellules endothéliales, très peu s'intéressent aux rôles que pourraient avoir les cellules musculaires lisses dans l'infiltration et la rétention des monocytes dans l'intima.

Le thromboxane A_2 est un médiateur possédant des propriétés stimulantes sur l'agrégation plaquettaire, l'induction de la vasoconstriction et la prolifération des cellules musculaires lisses. Il agit sur son propre récepteur : le récepteur TP. Le 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$ est un autre médiateur, issu de la dégradation non-enzymatique de l'acide arachidonique. Il est également capable de se lier au récepteur TP. Des niveaux supérieurs à la normale de ces deux médiateurs ont été mesurés dans le sang de personnes souffrant d'athérosclérose. L'aspirine peut être utilisée afin de réduire la vitesse de formation de la plaque athéromateuse. En effet, cette molécule va entraîner une inhibition de la COX-1 et donc une diminution de la concentration en thromboxane A_2 mais pas en 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$. Le 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$ représente donc une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'athérosclérose. Il est donc indispensable de caractériser en détail les effets induits par cette molécule sur les cellules de la paroi artérielle.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la régulation des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1 induite par des modulateurs du récepteur TP dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines.

Afin de nous assurer que le type cellulaire choisi est adapté à cette étude, nous avons tout d'abord caractérisé les cellules musculaires lisses vasculaires humaines, et vérifier que ces cellules expriment bien le récepteur TP.

Une fois le premier objectif atteint, nous avons étudié les effets d'agonistes et d'antagonistes du récepteur TP sur l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 et sur l'activation d'une voie de signalisation connue pour influencer cette expression. Il s'agit de la voie de la Jun kinase aboutissant à l'activation du facteur de transcription AP-1

Parallèlement, nous nous sommes intéressés aux effets que pourraient avoir les modulateurs du récepteur TP sur la voie NF- κ B, connue pour pouvoir induire une augmentation de l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1.

L'ensemble de ces résultats nous donnera une image des effets athérogènes potentiels des agonistes du récepteur TP.

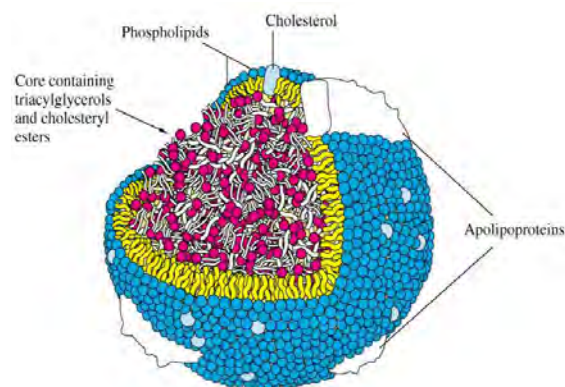


Figure I.1. : Structure d'une lipoprotéine

Le cœur de la lipoprotéine contient des triglycérides et du cholestérol estérifié. Ces lipides insolubles sont entourés d'une couche périphérique constituée de phospholipides, cholestérol et d'apoprotéines. (<http://www.uwsp.edu/chemistry/tzamis/ch260/lipoprotein.jpg>)

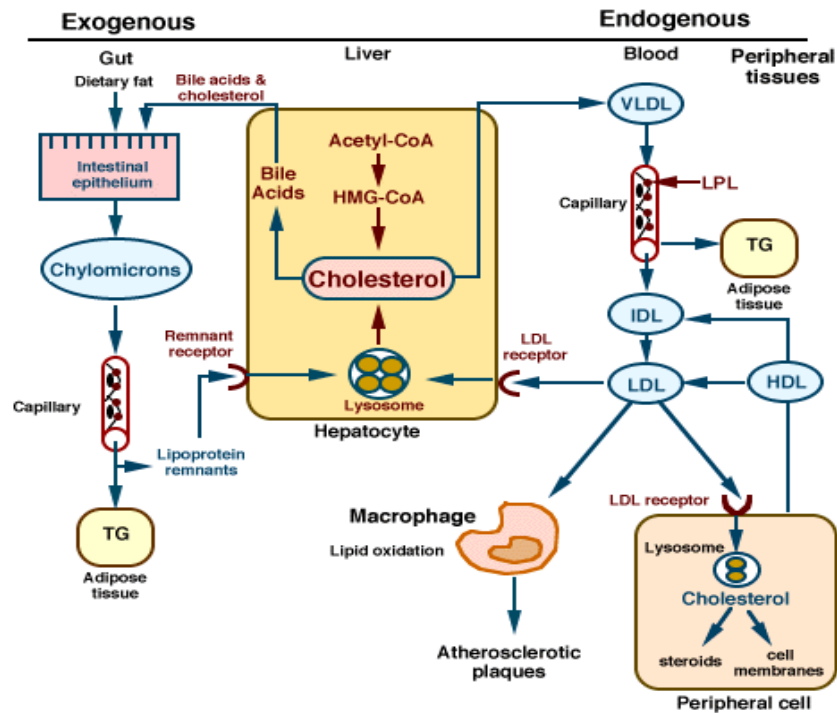


Figure I.2. : Métabolisme des lipoprotéines

La voie exogène concerne le métabolisme des chylomicrons issus des lipides alimentaires absorbés au niveau de l'intestin. Les résidus des chylomicrons (« *remnants* ») sont ensuite captés par le foie. La voie endogène concerne le métabolisme des VLDL, IDL, LDL et HDL. Les VLDL subissent l'action de la lipoprotéine lipase et sont transformées en IDL puis en LDL. Les LDL sont ensuite captées au niveau du foie, des tissus périphériques ou, s'ils sont oxydés, au niveau des macrophages. Ce dernier processus est à l'origine de la formation des lésions athéromateuses

(<http://www.ovc.uoguelph.ca/BioMed/Courses/Public/Pharmacology/pharmsite/98409/Blood/hyperlipidemia.html>).

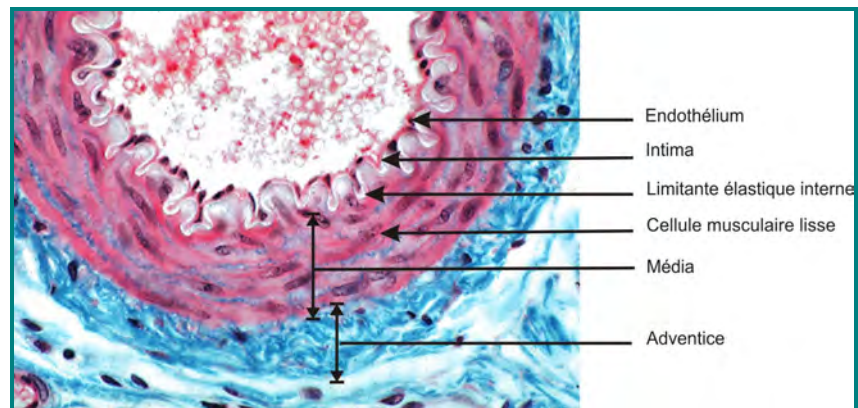


Figure I.3. : Coupe transversale d'une artère

La paroi artérielle est formée de trois couches. Du centre du vaisseau à la périphérie : l'intima, la média et l'adventice. La coupe est colorée au Trichrome de Masson.

(<http://webapps.fundp.ac.be/umbd/histohuma/histohuma/index.php?go=img&chap=45&pos=4&PHPSESSID=55c6282e567b38703accf6062085173c>)

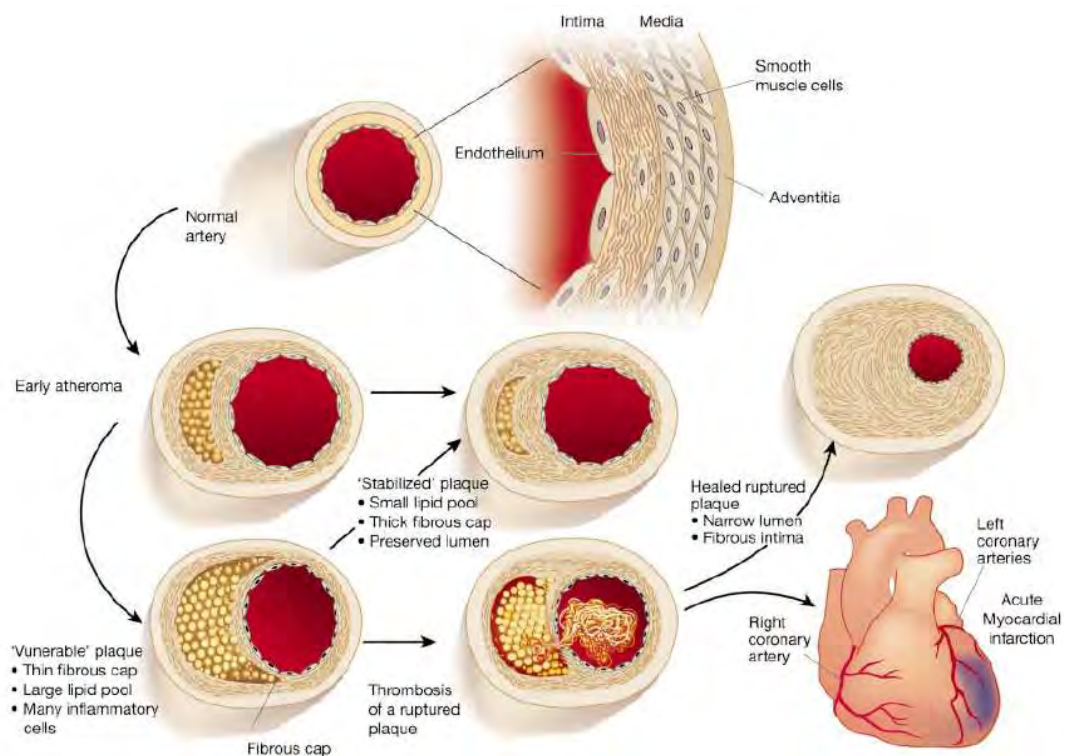


Figure I.4. : Schéma de la formation d'une plaque d'athérome

La lésion se forme de façon progressive et débute par l'accumulation de macrophages gorgés de lipides (*foam cells*). Cette accumulation correspond au stade de la strie lipidique. Une réponse inflammatoire va avoir lieu, et les cellules musculaires lisses vont migrer de la média vers l'intima et proliférer. Ces cellules sont à l'origine de la formation de la chape fibreuse. Les débris cellulaires, cristaux de cholestérol et autres cellules vont former le cœur nécrotique. C'est le stade de la plaque fibro-lipidique. L'évolution de la lésion dépend de la composition cellulaire de la plaque. Une chape fibreuse épaisse permettra de stabiliser la plaque, réduisant le risque d'accidents cardiovasculaire. Au contraire, une chape fibreuse trop fine sera synonyme de plaque instable. Des complications comme la rupture de la plaque et la formation d'un thrombus peuvent survenir et entraîner une thrombose (Libby, 2002).

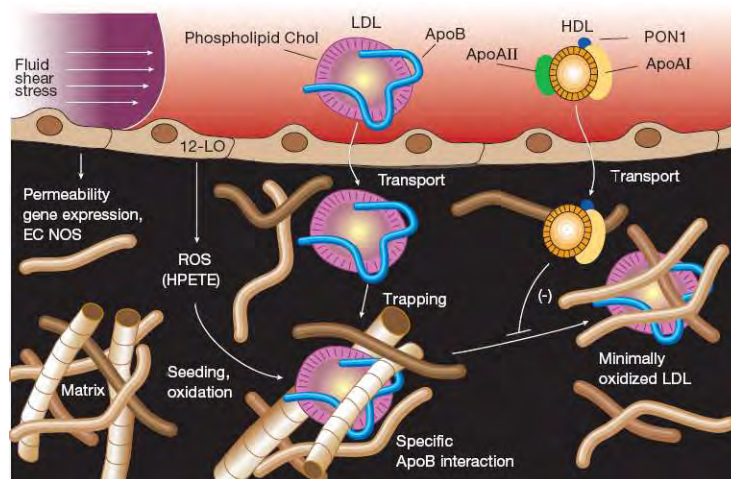


Figure I.5. : Interaction des LDL avec la matrice extracellulaire

Les LDL vont diffuser passivement à travers l'endothélium et interagir avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Les charges positives des résidus ApoB₁₀₀ vont s'associer aux charges négatives des glycoaminoglycanes (Lusis, 2000).

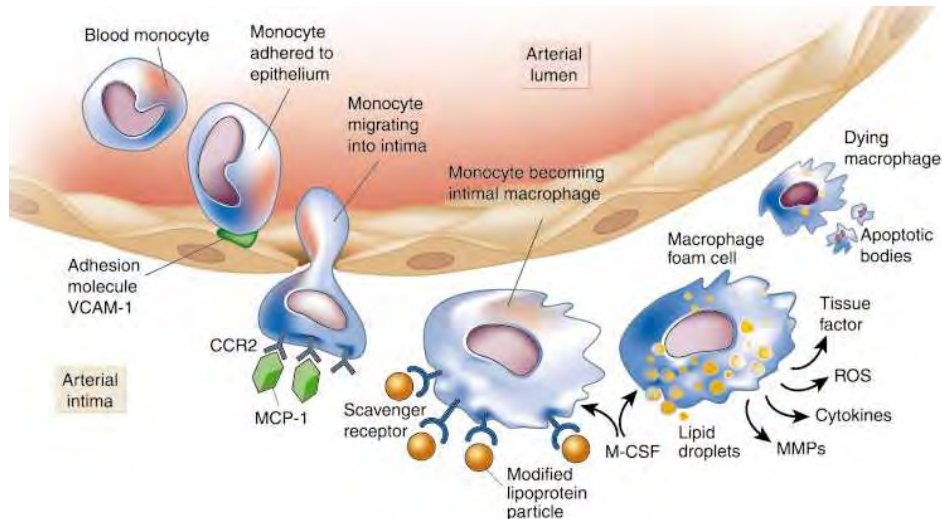


Figure I.6. : Initiation de la lésion et formation des cellules spumeuses

Des molécules d'adhérence telles que VCAM-1 et ICAM-1 vont être exprimées par l'endothélium. Cette expression va permettre la diapédèse des monocytes. La migration des monocytes est modulée par la sécrétion de facteurs chimiotactiques comme MCP-1. Les LDL oxydés jouent également un rôle chimiotactique. Les macrophages se différencient ensuite en cellules spumeuses (*foam cells*) par endocytose de LDL oxydées médiée par les récepteurs *scavenger*. Le cholestérol peut être évacué par la voie reverse vers le foie par l'intermédiaire des HDL (Libby, 2002).

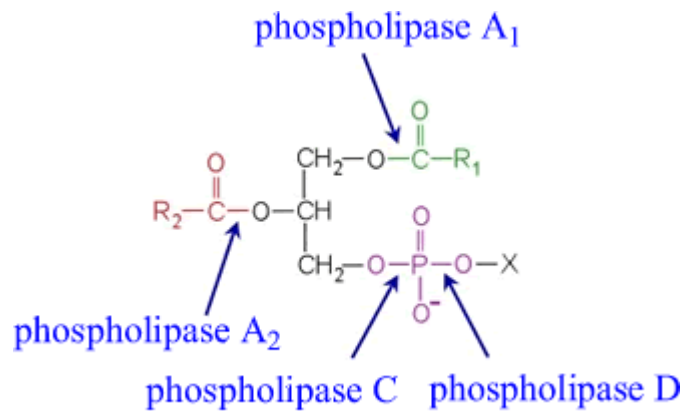


Figure I.7. : Action des différentes phospholipases

<http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/CHEM445/special/arachidonate.html>

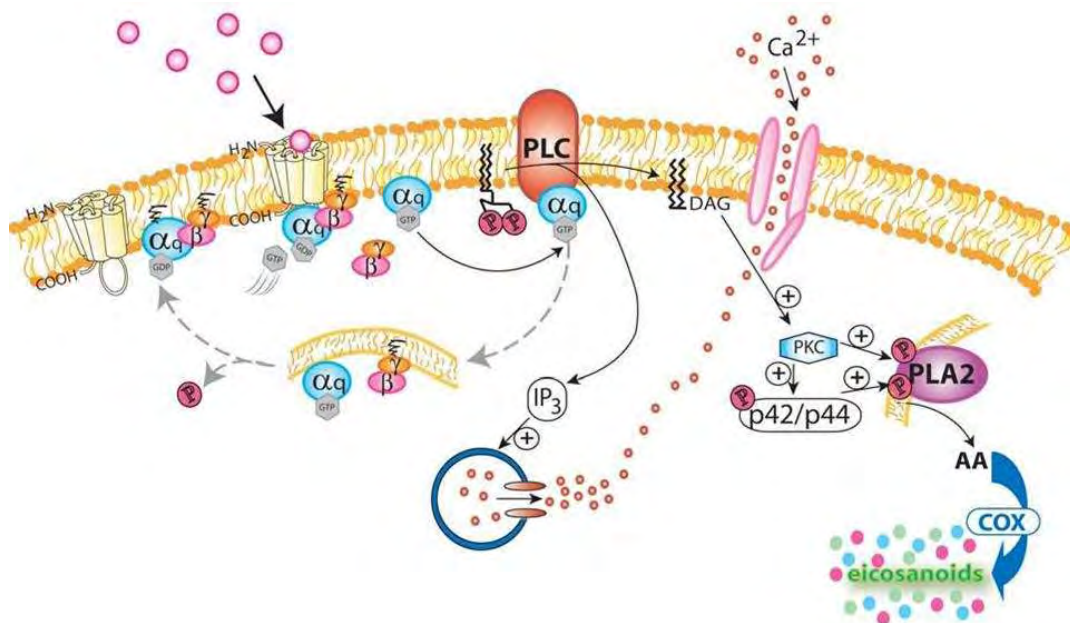


Figure I.8. : Transduction du signal par le récepteur du thromboxane A₂

Lors de la liaison de l'agoniste, le récepteur va changer de conformation et va acquérir un GTP par sa sous-unité α (α_q). Cette sous-unité va se dissocier du complexe qu'elle formait avec les sous-unités β et γ . La sous-unité α va alors aller activer la phospholipase C qui va libérer des messagers secondaires : l'inositol-3-phosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). L' IP_3 va permettre la mobilisation du calcium intracellulaire en se fixant sur son récepteur. Le DAG (resté ancré en membrane) et le calcium sont à l'origine de l'activation et de la translocation de la protéine kinase C en membrane (Figure modifiée de Billington, 2003).

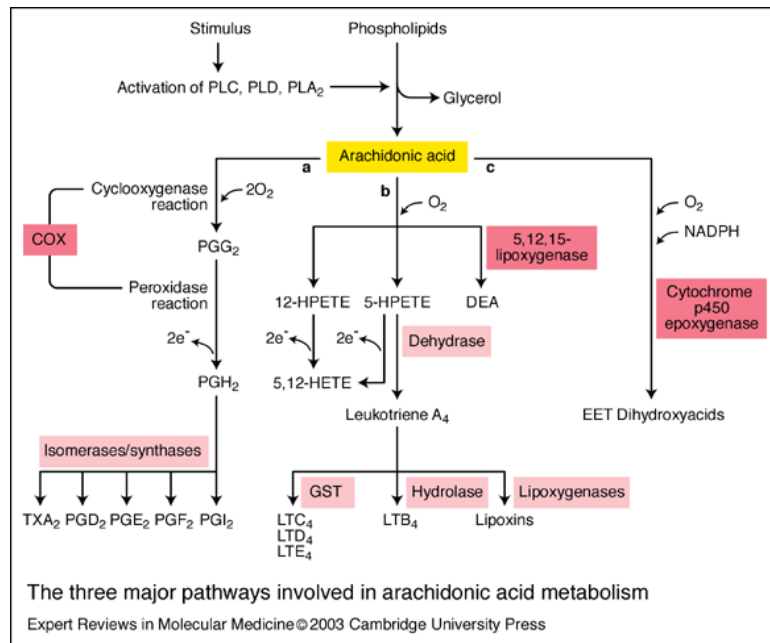


Figure I.9. : Cascade de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est libéré lors de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par les phospholipases. Il devient alors le substrat de 3 voies métaboliques différentes : la voie des cyclooxygénases, des lipoxygénases et des époxygénases. Chacune de ces voies génère respectivement les prostanoïdes, les leucotriènes et les époxydes. phospholipase (PL), prostaglandine (PG), thromboxane A₂ (TXA₂), cyclooxygénase (COX), acide hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE), acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE), leucotriène (LT). (<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03005854h.htm>).

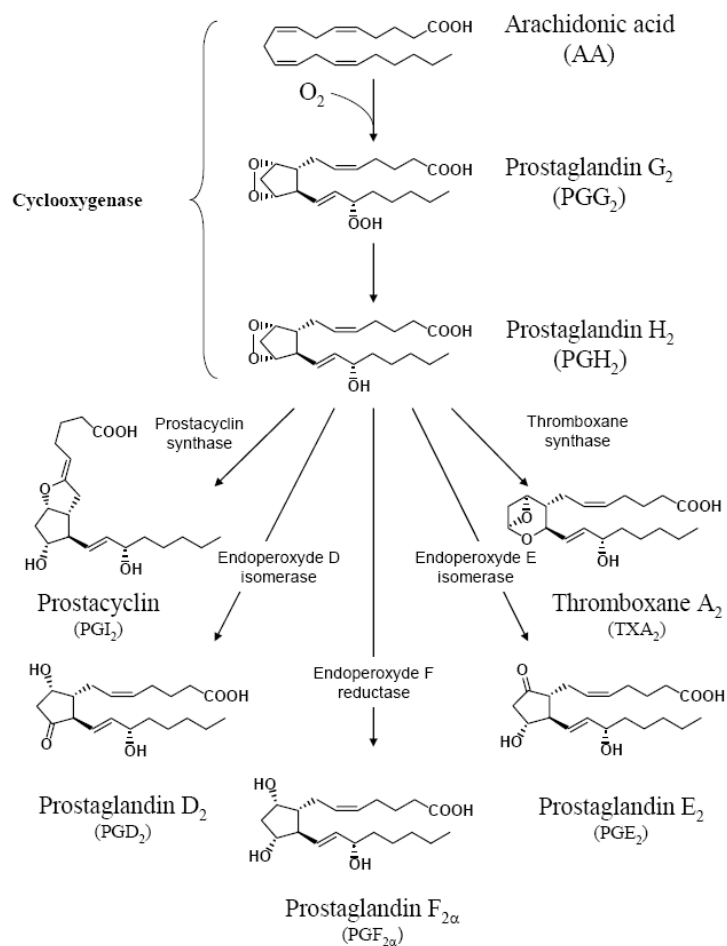


Figure I.10. : Voie des cyclooxygénases. La dégradation de l'acide arachidonique par la voie des cyclooxygénases génère la prostacycline, le thromboxane A_2 et les prostaglandines (Hanson, 2007)

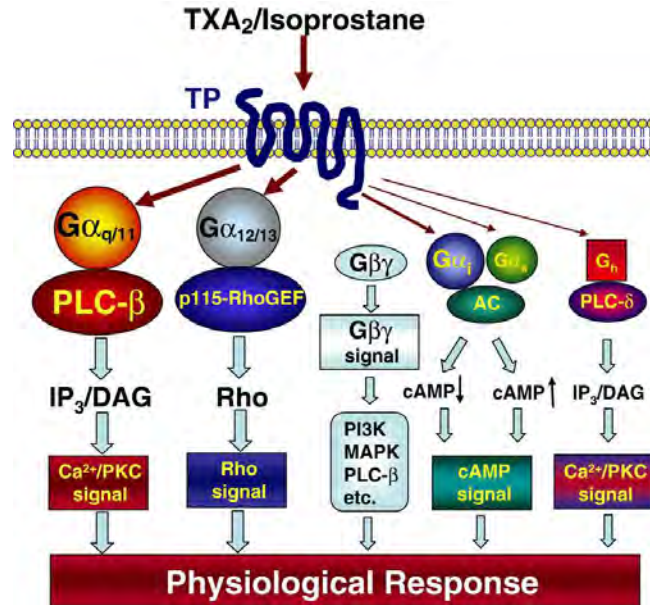


Figure I.11. : Voies de signalisation du récepteur TP

Le récepteur TP peut être couplé à un nombre varié de protéines G, qui ont chacune une voie de transduction particulière. Phospholipase C-β (PLC-β); p115 guanine nucleotide exchange factor pour Rho (p115-RhoGEF); adénylyl cyclase (AC); phospholipase C-δ (PLC-δ); inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3); diacylglycérol (DAG); AMP cyclique (cAMP); phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K); mitogen-activated kinase (MAPK); protéine kinase C (PKC) (Nakahata, 2008).

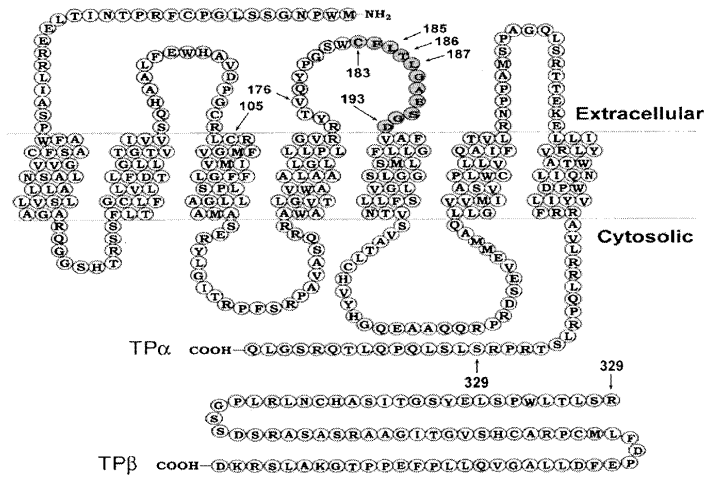


Figure I.12. : Structure des isoformes TPα et TPβ, récepteurs du TXA₂ (Huang et al, 2004).

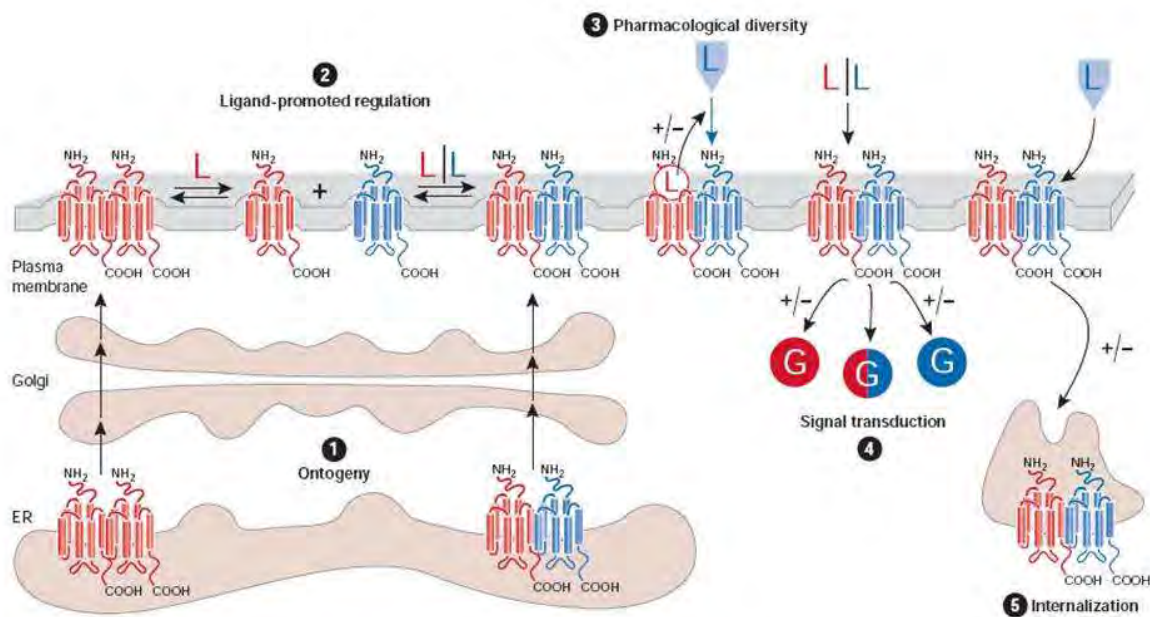
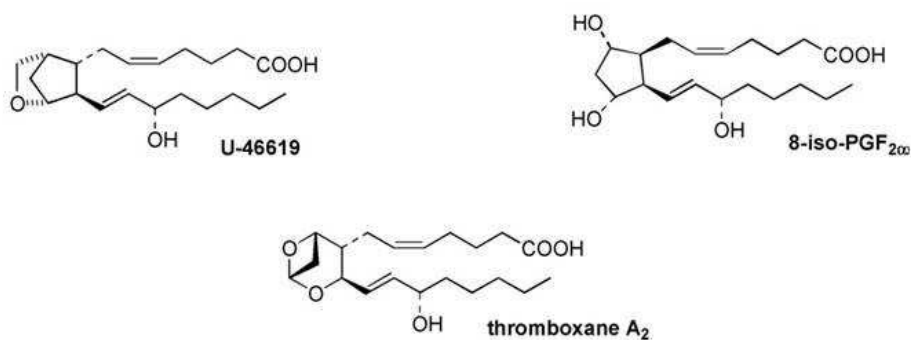


Figure I.13. : Rôles potentiels des récepteurs couplés aux protéines G dimérisés.

- 1) transport des récepteurs du réticulum endoplasmique vers la surface cellulaire pour permettre la maturation du récepteur.
 - 2) Une fois en membrane, régulation des dimères par les ligands.
 - 3) Influencer positivement ou négativement l'activation par des ligands.
 - 4) Augmentation ou atténuation de la signalisation ou encore changement de protéine G couplée aux récepteurs.
 - 5) Co-internalisation des récepteurs après stimulation d'un seul.
- (Terrillon & Bouvier, 2004)

TP agonists



TP antagonists

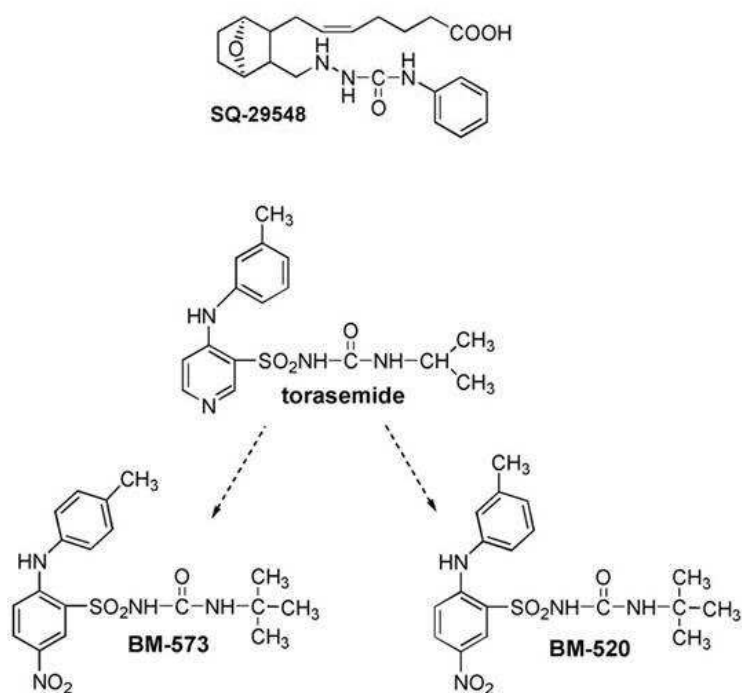


Figure I.14 : Structure d'agonistes et d'antagonistes du récepteur TP.

Agonistes : U46619, 8-iso-PGF_{2α} et thromboxane A₂

Antagonistes : SQ29548, torasémide, BM-573 et BM-520

(Rolin *et al.*, 2007)

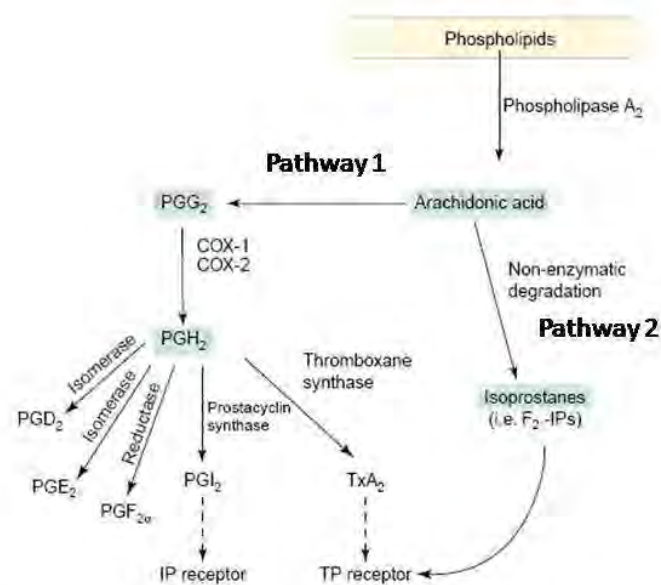


Figure I.15 : Voies de dégradation de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique peut se faire dégrader de manière enzymatique, menant à la formation de prostanoïdes, mais aussi de manière non-enzymatique. Cette dernière voie mène à la production de molécules appelées isoprostanes. Le 8-*iso*-PGF_{2α} fait partie de cette famille et est capable de se lier au récepteur du thromboxane A₂ (Dogné *et al.*, 2005).

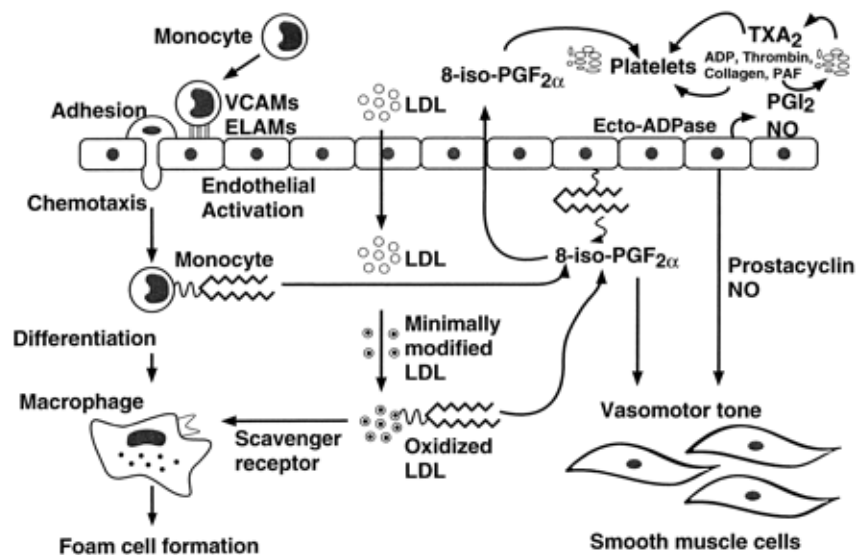


Figure I.16. : Site de formation du 8-iso-PGF_{2α} et cellules cibles dans la pathologie athéromateuse.

Le 8-iso-PGF_{2α} est formé à partir des phospholipides membranaires et des LDL. Il est capable d'agir sur les cellules musculaires lisses et les plaquettes. (Patrono *et al*, 1997)

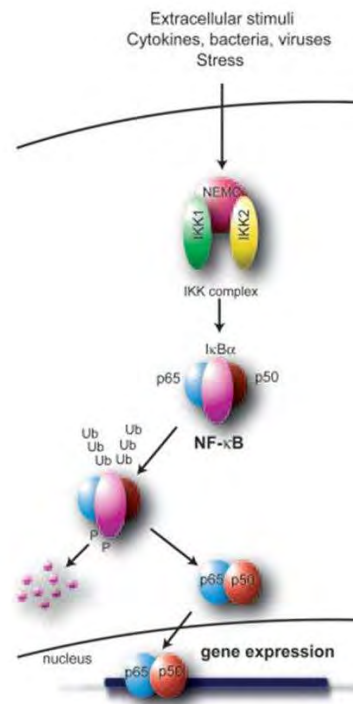


Figure I.17. : Voie d'activation canonique de NF-κB

La voie d'activation classique de NF-κB implique l'activation du complexe IKK et la dégradation d'I-κBα. Le dimère NF-κB peut ensuite effectuer une translocation nucléaire (de Winther., 2005)

II. Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des cellules musculaires lisses de la lignée T/G HA-VSMC. Ces cellules d'origine humaine ont été prélevées de l'aorte d'un enfant (féminin) de 11 mois de type caucasien, et proviennent de l'entreprise LGC Promochem. Elles peuvent être cultivées dans des boîtes de 25 cm², 75 cm², ou encore dans des plaques 24 puits contenant des lames couvre-objets lorsqu'elles sont destinées à des expériences d'immunomarquage. Les cellules sont repiquées une à deux fois par semaine. Elles sont maintenues dans une étuve à une température de 37°C, avec une atmosphère contenant 5% de CO₂ (Cambrex, Belgique) et un environnement humide.

1.1. Matériel

- Milieu de culture F12 Nutrient Mixture (HAM) avec L-Glutamine (Gibco, UK)
- Sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
- Trypsine-EDTA (Gibco, UK)
- Tampon de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline) (Gibco, UK)
- Boîte de culture stérile de 25 (T75) ou 75 cm² (T75) (Cell Star, Greiner Bio-one, Allemagne)
- Plaque 24 puits stérile (Falcon, Becton Dickinson, France)
- Tubes de 10 ml
- Pipettes stériles (2, 5, 10 et 25 ml) (Sarstedt, Allemagne)
- Incubateur à 37°C (5% de CO₂) (Thermo Electron Corporation, USA)
- Centrifugeuse (Hettich, Allemagne)
- Hotte à flux laminaire Gelaire (ICN, USA)

1.2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans du milieu F12 (Gibco) contenant 0,2% de glutamine (Gibco), 0,2% d'acides aminés non-essentiels (NEAA) (Gibco), 0,2% d'acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic (HEPES) (Gibco), 0,3% de (N-{tris(hydroxymethyl)methyl}-2-aminosulfonic acid) (TES) (Gibco), de l'acide ascorbique, 0,08% d'insulin transferrine selenium (ITS) (Gibco), 0,02% de bovine pituitary extract (BPE) (Gibco) et 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco). Les cellules sont repiquées lorsqu'elles atteignent un pourcentage de confluence élevé. Cette procédure se déroule en conditions stériles. Le milieu F12 complet, la trypsine et le PBS sont préchauffés à 37°C. Les boîtes T75 contenant les cellules repiquées sont décantées. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec 5 ml de PBS puis 2 ml de trypsine-EDTA sont ajoutés pendant 3 à 5 minutes. Après l'observation au microscope de l'arrondissement des cellules et de leur détachement, la trypsine est neutralisée par l'ajout de 8 ml de milieu F12 contenant 10 % de sérum de veau fœtal). Pour éliminer la trypsine et l'EDTA, la suspension de cellules est centrifugée 4 minutes à 1000 rpm. Le culot est ensuite remis en suspension dans 4 ml de milieu complet et transféré dans de nouvelles boîtes T75 à une dilution de 1/2. Le volume final est porté à 20 ml avec du milieu F12 complet. Lors des expériences d'immunomarquage, les cellules sont repiquées à une densité de 50.000 cellules par puits dans une plaque 24 puits.

2. Stimulation des cellules

2.1. Molécules utilisées :

- **U46619** (Cayman Chemical, USA). Agoniste du récepteur TP, il est préalablement dissous dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) (Acros) et stocké à -20°C . Sa concentration stock est de 3×10^{-2} M (solution mère). Il est généralement utilisé à une concentration de $1 \mu\text{M}$.
- **8-iso-PGF_{2α}** (Cayman Chemical, USA). Agoniste du récepteur TP, il est préalablement dissous dans du DMSO et stocké à -20°C . Sa concentration stock est de 2×10^{-2} M (solution mère). Il est généralement testé à une concentration de $50 \mu\text{M}$.
- **SQ29548** (Cayman Chemical, USA). Antagoniste du récepteur TP, il est préalablement dissous dans du DMSO et stocké à -20°C . Sa concentration stock est de 2×10^{-3} M (solution mère). Il est généralement utilisé à une concentration de $1 \mu\text{M}$.
- **BM-573** et **BM-520**. Antagonistes du récepteur TP, ils sont préalablement dissous dans du DMSO et stockés à -20°C . Leurs concentrations stock est de 2×10^{-3} M. Ils sont généralement utilisés à une concentration de $1 \mu\text{M}$.
- **Interleukine-1 bêta** (IL-1 β). Cytokine pro-inflammatoire, sa concentration stock est de $10 \mu\text{g/ml}$ dans du PBS stérile. Il est employé à une concentration de 3 ng/ml

2.2. Méthode

Le milieu des boîtes est décanté et les cellules sont rincées avec du PBS à 37°C . Les milieux de stimulation sans sérum contenant la ou les molécules à tester sont ensuite disposés dans les boîtes ou puits. Les temps d'incubation sont de 6 heures ou de 16 heures pour les agonistes et l'IL-1 β . Lorsque l'effet des antagonistes est étudié, ces molécules sont mises en contact avec les cellules 1 heure avant la stimulation en présence de l'IL-1 β et/ou des agonistes.

3. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford

Le dosage de Bradford permet de quantifier la concentration en protéines des différents extraits cellulaires. Cette concentration est déterminée par un dosage colorimétrique utilisant un colorant, le Bleu de Coomassie. Celui-ci a la capacité de se fixer sur les résidus hydrophobes des protéines. L'absorbance mesurée est alors proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

3.1. Matériel

- Solution Bradford dilué 5x et filtrée : colorant Bio-Rad Protein Assay 500-0006 (Bio-Rad, USA)
- Etalon BSA 2 µg/µl (Bovine Serum Albumin, Sigma)
- Eau distillée
- Tampon dans lequel l'échantillon à doser se trouve
- Spectrophotomètre Ultrospec 2100 pro

3.2. Méthode

Chaque tube contient 1 ml de solution de Bradford dans lequel 4 µl d'échantillon sont ajoutés. Le blanc mesuré pour les échantillons est le tampon de lyse utilisé lors de l'extraction protéique. 2 µl de BSA, étalon de concentration connue, est également dosé. Le tube servant de blanc pour l'étalon BSA contient 2 µl d'eau. Chaque mesure est effectuée en double. Après 5 minutes (temps optimal de la réaction colorimétrique), l'absorbance des échantillons est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro UVI visible spectrophotometer). La valeur d'absorbance de l'étalon de concentration connue permet le calcul de la quantité de protéines (µg/µl) présentes dans l'échantillon selon la formule :

$$\frac{(\text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ Echantillon} - \text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ Blc Echantillon}) / (\text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ Etalon} - \text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ Blc Etalon}) \times 2 \mu\text{g}}{\text{Volume échantillon } (\mu\text{l})}$$

4. Extraction nucléaire

4.1. Matériel (Tableau II.1.)

- PBS froid + 1 mM Na₂MoO₄ + 5 mM NaF
- Tampon HB 10x (Hypotonic Buffer)
- Tampon de lyse 0,2% NP-40
- RE (Resuspension Buffer)
- SA (Saline Buffer)
- PIC (Protease Inhibitor Cocktail)
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer)

4.2. Méthode

Après l'incubation, les boîtes T25 sont placées sur glace et rincées 1 fois avec 5 ml de PBS froid (contenant 1 mM Na₂MoO₄ et 5 mM NaF) avant d'être incubées en présence de 3 ml de tampon HB 1x durant 3 minutes. Les boîtes sont décantées et les cellules raclées dans 500 µl de tampon de lyse 0,2% NP-40 (Tableau II.1.) pour finalement être transférées dans des microtubes. Le tampon de lyse utilisé contient un détergent neutre qui va permettre une perméabilisation de la membrane plasmique tout en conservant la membrane nucléaire intacte. Les microtubes sont ensuite centrifugés 30 secondes à 13.000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot (contenant les noyaux) est resuspendu dans 50 µl de tampon de resuspension complété d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Tableau II.1.) (1 ml RE + 40 µl PIC + 40 µl PIB). Une fois le culot resuspendu, un volume équivalent de tampon salin contenant lui aussi des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (1 ml SA + 40 µl PIC + 40 µl PIB) est ajouté. Les microtubes sont ensuite agités sur roue à 4°C pendant 30 minutes maximum avant d'être centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm et à 4°C. Les surnageants sont finalement aliquotés

et congelés à -70°C . 10 μl sont collectés et placés à -20°C pour une quantification ultérieure de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.

5. Extraction protéique totale

5.1. Matériel (Tableau II.2.)

- Tampon de lyse 2x
- Triton X-100
- PIC (Protease Inhibitor Cocktail)
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer)

5.2. Méthode

Après stimulation et incubation, les boîtes T25 (Cell Star) sont placées sur glace et décantées. 200 μL de tampon de lyse 1x (Tableau II.2.) sont étalés dans chaque boîte et les cellules sont raclées puis transférées dans des microtubes sur glace. Le lysat est ensuite centrifugé 5 minutes à 13.000 rpm à 4°C . Le surnageant est finalement aliquoté et conservé à -70°C . 10 μl sont collectés et placés à -20°C pour une quantification ultérieure par la méthode de Bradford.

6. Extraction totale de protéines membranaires

6.1. Matériel

- Tampon de lyse DLA (Urée 7 M, Thiourée 2 M, CHAPS 4%, DTT 60 mM, PIC 0.16%)
- PBS froid

6.2. Méthode

Après l'incubation, les boîtes T25 sont placées sur glace. Les cellules sont rincées et récupérées par raclage dans 500 μl de PBS froid. Après avoir été transférées dans des microtubes, elles sont centrifugées 4 minutes à 2500 rpm et les surnageants sont éliminés. Ensuite, les cellules sont lysées dans 100 μl de DLA à température ambiante. Les lysats sont centrifugés une dernière fois pendant 15 minutes à 13.000g et à température ambiante. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux microtubes qui seront conservés à -70°C . 10 μl sont collectés et placés à -20°C pour une quantification ultérieure de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.

7. Mesure de la liaison de facteurs de transcription à leur séquence consensus par dosage colorimétrique (Test Trans-AM)

Le but poursuivi est de mesurer la capacité de liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus sur l'ADN. Des sondes de capture double brin contenant le site consensus reconnu par le facteur de transcription sont fixées dans les puits d'une plaque 96 puits. Des extraits protéiques nucléaires sont réalisés après incubation des cellules et placés dans ces

puits. La détection de la liaison du facteur de transcription d'intérêt à sa séquence consensus se fait par une incubation d'un anticorps primaire spécifique du facteur de transcription et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP. En présence du substrat de l'enzyme, un résultat colorimétrique quantifiable est obtenu.

8. Fixation d'ADN double-brins sur puits

8.1. Matériel

- PBS (tampon phosphate 10mM pH 7,4, NaCl 150mM)
- PBS 50 (tampon phosphate 10mM pH 7,4, NaCl 50mM)
- Tween (Tween 20, Sigma)
- ADN trappeur biotinylé contenant la séquence consensus du facteur de transcription d'intérêt
- Eau distillée
- Chambre chaude
- Plaque 96 puits coatée à la streptavidine

8.2. Méthode

L'ADN trappeur est dilué à une concentration finale de 4 pmoles / 50 µl dans du PBS. 50 µl de cette dilution sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite recouverte d'un transparent autocollant et incubée 60 minutes à 37°C. Les puits sont ensuite rincés 2 fois avec 100 µl de PBS 50 / 0,1% Tween 20 et 1 fois avec 200 µl d'eau distillée. La plaque est finalement séchée à 37°C pendant 30 minutes puis recouverte d'un transparent autocollant et conservée à 4°C.

9. Dosage colorimétrique de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription

9.1. NF-κB

9.1.1. Matériel

- Plaque 96 puits fonctionnalisée avec des oligonucléotides doubles brins contenant une séquence consensus pour NF-κB (Active Motif, Belgium)
- Tampon de liaison concentré (Tableau II.3.)
- Tampon de liaison complet concentré 1x (Tableau II.3.)
- Tampon de lyse stock (Tableau II.3.)
- Tampon de lyse complet (Tableau II.3.)
- PBS 50 (tampon phosphate 10mM pH 7,4, NaCl 50mM)
- Tween (Tween 20, Sigma)
- Lait en poudre 1% (Gloria, Nestlé)
- Anticorps Anti-p65 (C-20 sc-372)
- Anticorps Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase
- TMB contenant le substrat de la peroxydase (BioSource, Belgium)
- Solution STOP (BioSource, Belgium)
- Lecteur de plaque Ultramark microplate imaging system (Bio-Rad)

9. 1. 2. Méthode

9. 1. 2. 1. Liaison du facteur à l'ADN

Tous les puits reçoivent 30 µl de tampon de liaison complet. Chaque condition test est réalisée en triples et trois « blancs » sont également prévus. 20 µl de tampon de lyse complet comprenant 10 µg de protéines sont ajoutés pour chaque condition. Les « blancs » ne contiennent que du tampon de lyse complet. La liaison des protéines aux oligonucléotides a lieu au cours d'une incubation à température ambiante et avec une agitation douce sur vortex. Après 1 heure d'incubation, les puits sont lavés 3 fois avec 200 µl de PBS 50 + Tween 0,1%.

9. 1. 2. 2. Fixation de l'anticorps primaire

100 µl d'anticorps anti-p65 dilué 1.000 fois dans du PBS 50 + Gloria 1% sont placés dans chaque puits. Ils sont incubés 1 heure à température ambiante avant d'être lavés 3 fois avec 200 µl de PBS 50 + Tween 0,1%.

9. 1. 2. 3. Fixation du conjugué anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase

100 µl de conjugué dilué 1.000 fois dans du PBS 50 + Lait en poudre 1% sont placés dans chaque puits. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les puits sont lavés 4 fois avec 200 µl de PBS 50 + Tween 0,1%.

9. 1. 2. 4. Révélation

100 µl de TMB sont versés dans chaque puits et la plaque est incubée à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 10 minutes. Un volume équivalent de solution stop est ajouté dans chaque puits et la D.O. est lue à 405 nm (référence 655 nm). La moyenne des D.O. est calculée pour chaque condition et la moyenne des blancs est ensuite soustraite.

9. 2. AP-1

9. 2. 1. Matériel

- Plaque 96 puits fonctionnalisée avec des oligonucléotides doubles brins contenant une séquence consensus pour AP-1
- Tampon de liaison concentré 3x (Tableau II.3.)
- Tampon de liaison complet concentré 1x (Tableau II.3.)
- Tampon de lyse (Tableau II.3.)
- PBS 50 (tampon phosphate 10mM pH 7,4, NaCl 50mM)
- Tween (Tween 20, Sigma)
- Tampon RE (Tableau II.1.)
- Tampon SA (Tableau II.1.)
- BSA (Bovine Serum Albumine)
- Anticorps Anti-c-Jun (H-79 sc-1694)
- Anticorps Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase
- TMB contenant le substrat de la peroxydase (Bio Source, Belgium)
- Solution STOP (Bio Source, Belgium)
- Lecteur de plaque Ultramark microplate imaging system (Bio-Rad)

9.2.2. Méthode

Le protocole utilisé est exactement le même que pour la liaison de NF- κ B, hormis deux petites différences :

- Les anticorps primaire et secondaire sont dilués 1.000 fois dans du PBS 50 + BSA 1%.
- La D.O. est lue à 450 nm (référence 655 nm).

10. Immunofluorescence

L'immunofluorescence permet de visualiser la localisation d'une protéine au sein d'une cellule. Le principe de l'immunofluorescence se base sur la reconnaissance de la protéine par un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre celle-ci. Un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome reconnaît ensuite l'anticorps primaire. L'outil de visualisation utilisé est un microscope confocal à fluorescence. Le fluorochrome est excité par un laser et réémet à une longueur d'onde précise indiquant la localisation de la protéine dans la cellule. Le noyau des cellules peut également être marqué par un agent intercalant (To-Pro-3).

10.1. Matériel

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Plaque 24 puits (Falcon, Becton Dickinson, France) ▪ Lamelles couvre-objets de 13 mm de diamètre (VWR, Belgique) ▪ Lames porte-objets 2,6 x 7,6 cm (VWR, Belgique) ▪ PBS (Phosphate Buffer Saline, (tampon phosphate 10mM pH 7,4, NaCl 150mM)) ▪ PBS + Paraformaldéhyde (PFA) 4% ▪ PBS + Triton X-100 1% | <ul style="list-style-type: none"> ▪ PBS + BSA (Bovine serum albumin) 2% ▪ Anticorps primaire (Tableau II.4.) ▪ Anticorps secondaire (Tableau II.5.) ▪ To-Pro 3 (Molecular Probe, USA) dilué 80 fois dans de la RNase 2 mg/ml de PBS ▪ Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne, UK) ▪ Microscope confocal (Leica) |
|---|--|

10.2. Méthode

Les milieux des cellules sont décantés à la pipette pasteur et 400 μ l de solution de PFA à 4% sont déposés dans chaque puits pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois au PBS. Elles peuvent ensuite être perméabilisées avec 400 μ l de PBS + Triton X-100 1% durant 5 minutes (cette étape n'est pas réalisée lors de mise en évidence de protéines de la membrane plasmique). 3 nouveaux rinçages de 5 minutes chacun avec 1 ml de PBS/BSA 2% sont réalisés. 30 μ l d'anticorps primaire sont déposés sur du parafilm placé en chambre humide, et les lamelles couvre-objets sont ensuite placées sur l'anticorps (face cellulaire vers le bas) pour une incubation de 2 heures à température ambiante. Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois au PBS/BSA 2%. L'incubation avec l'anticorps secondaire se déroule selon le même procédé que l'anticorps primaire, excepté qu'elle ne dure que 60 minutes et qu'elle a lieu à l'abri de lumière pour préserver le fluorochrome. Après 3 rinçages au PBS, les noyaux sont marqués au To-Pro 3 : 30 μ l de To-Pro 3 dilué 80x sont incubés avec les lamelles couvre-objets pendant 30 minutes, toujours à l'abri de la lumière. Finalement, après 3 rinçages des

cellules au PBS, les lamelles couvre-objets sont montées sur une goutte de milieu de montage (Mowiol) préchauffée à 57°C, préalablement déposée sur une lame porte-objet. Les lames peuvent être conservées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'observation au microscope confocal.

11. Western Blot

Le Western Blot permet de mettre en évidence l'abondance de protéines d'intérêt au sein d'un échantillon. Cette technique se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, les protéines des différents échantillons subissent une séparation par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Avant d'être transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride). La protéine d'intérêt est finalement mise en évidence par l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique.

11. 1. Matériel

- Acrylamide/Bisacrylamide (30/0,8) (Bio Rad Laboratories)
- APS 25% (Ammonium PerSulfate) (Amersham BioSciences, Sweden)
- TEMED (Amersham BioSciences, Sweden)
- Tampon de gel de séparation (Gel Buffer) (Tableau II.6.)
- Mélange pour gel séparateur (Gel Buffer Mix) (Tableau II.6.)
- Gel séparateur (Tableau II.6.)
- Tampon de gel concentrateur (Spacer Gel Buffer) (Tableau II.6.)
- Mélange pour gel concentrateur (Spacer Gel Mix) (Tableau II.6.)
- Gel concentrateur (Tableau II.6.)
- Tampon de migration (Running Buffer) (Tableau II.6.)
- Bleu de charge 5x (Tableau II.6.)
- Etalon (SeeBlue Plus 2 1x, Invitrogene)
- Tampon de transfert (Blotting Buffer) (Tableau II.6.)
- TBS (Tris Buffer Saline) 10X
- TBS-Tween 0,1 %
- ECL Blocking Agent (Amersham BioSciences, Sweden)
- Solution de révélation (ECL Western Blot Detection Kit, Amersham BioSciences, GE Healthcare, UK)

11. 2. Méthode

11. 2. 1. Préparation des gels

Des gels d'acrylamide de 12% ont été réalisés. La composition de ce gel est reprise au Tableau 6. Les plaques sont d'abord montées et le gel séparateur est coulé et laissé à polymériser pendant environ 1 heure à température ambiante. Durant la polymérisation, le gel est recouvert par une fine couche d'isobutanol afin que le gel soit préservé de l'oxygène. Une fois la polymérisation terminée, l'isobutanol est éliminé et le gel est abondamment rincé à l'eau distillée. Le gel concentrateur est ensuite coulé et le peigne est introduit verticalement. Après approximativement 45 minutes de polymérisation, le peigne, les pinces et le spacer du bas sont enlevés. Durant ce deuxième temps de polymérisation, les échantillons protéiques sont préparés.

11. 2. 2. Echantillons et migration

Les échantillons sont préparés dans des microtubes et ont un volume final de 37,5 µl. Ils comprennent 1 à 10 µg (selon le type d'échantillon) de protéines dilués dans de l'eau distillée ainsi que 7,5 µl de Bleu de charge 5x. Avant d'être chargés, les échantillons sont

fermés avec des clips et dénaturés par un passage de 3 à 4 minutes dans un bloc chauffant (100°C). Une brève centrifugation a lieu une fois que les échantillons sont refroidis. Pendant ce temps, le gel est monté dans la cuve et du tampon de migration est ajouté dans le compartiment supérieur. Après avoir vérifié l'étanchéité des joints, le tampon de migration est ajouté dans le compartiment inférieur. Les bulles d'air sous le gel sont éliminées à l'aide d'une seringue et les puits sont rincés avec du tampon de migration. 35 µl de chaque échantillon ainsi que 20 µl d'étalon sont chargés dans les puits. La migration des échantillons a lieu à travers le gel concentrateur à un ampérage de 35 mA pendant 30 minutes, ensuite à travers le gel séparateur à 45 mA pendant 3 heures.

11. 2. 3. Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

Après migration des échantillons, le gel est démoulé, le gel concentrateur est enlevé et les protéines vont être transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride). Un montage en « sandwich » est réalisé avec un masque, des papiers Whatman et des éponges imbibées de tampon de transfert. La membrane est réhydratée pendant une minute dans du méthanol 100% puis 5 minutes dans du tampon de transfert. Le gel est ensuite déposé sur la membrane et le « sandwich » est placé dans une cuve de transfert pour un transfert semi-sec. Le transfert se déroule soit 2 heures à 150 mA, soit durant la nuit à 30 mA.

11. 2. 4. Traitement de la membrane

Après le transfert, le « sandwich » est démoulé et la membrane est incubée 2 heures dans du TBS-Tween 0,1% contenant 2% d'agent bloquant (Kit ECL, Amersham). La membrane est incubée 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps primaire (Tableau II.7.). Les dilutions varient d'un anticorps primaire à l'autre, et les différentes dilutions effectuées sont reprises dans le Tableau 7. Les anticorps primaires sont dilués dans du TBS-Tween 0,1% contenant 2% d'agent bloquant. Après l'incubation, 3 rinçages de 15 minutes avec du TBS-Tween 0,1% sont effectués. La membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps secondaire. Des anticorps secondaires anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris, couplés à la HRP (Horse Raddish Peroxidase), sont utilisés en fonction de l'anticorps primaire utilisé (Tableau II.7.). Ceux-ci sont généralement dilués 200.000x dans du TBS- Tween 0,1% contenant 2% d'agent bloquant. L'incubation a lieu pendant 45 minutes puis la membrane est rincée 4 fois pendant 15 minutes avec du TBS- Tween 0,1%.

11. 2. 5. Révélation

La technique de révélation utilisée pour détecter la présence des protéines d'intérêt est la chimioluminescence. La solution de révélation ECL Advance™ (Amersham Pharmacia Biotech) est réalisée en mélangeant des volumes équivalents de solutions A et B. La membrane est ensuite recouverte d'un fin film de solution de révélation pendant 5 minutes. Elle est finalement placée entre 2 transparents dans une cassette de révélation et est mise au contact d'un film sensible (Amersham Hyperfilm ECL) en chambre noire. Le temps d'exposition du film varie en fonction de la charge du gel en protéines et de l'anticorps utilisé. Le film est finalement placé dans le révélateur et les bandes de la protéine d'intérêt apparaissent.

NB : La membrane peut être congelée à -20°C. Elle peut également subir plusieurs hybridations successives mais elle doit être rincée et incubée 2 heures en présence d'agent bloquant avant chaque nouvelle révélation.

12. Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR en temps réel

La RT-PCR en temps réel est une méthode permettant la quantification de l'expression de gènes. Après stimulation des cellules, l'ARN des cultures cellulaires est extrait et rétrotranscrit en ADNc. Les amorces spécifiques des gènes d'intérêt vont permettre une amplification ciblée et le SYBR Green, agent intercalant de l'ADN double brin, un marquage fluorescent. La quantification de l'ARN utilise le concept de « cycle seuil » : le signal de fluorescence émis par les amplicons doit se distinguer du bruit de fond. Les valeurs sont finalement normalisées par rapport à un contrôle.

12. 1. Extraction d'ARN total

L'extraction est réalisée à partir de boîtes T75. Afin d'obtenir des ARN de bonne qualité, l'extraction se déroule en conditions dites « RNase Free ». Pour empêcher l'action des RNases endogènes et exogènes, différentes précautions doivent être prises : effectuer la plupart des manipulations à 4°C, utiliser du matériel exempt de RNase, porter des gants en latex RNases free et traiter l'espace de travail au SDS 1%.

12. 1. 1. « RNAgents Total RNA Isolation System » (Promega)

12. 1. 1. 1. Matériel

- Eau auto-clavée 2 fois RNase free
- Ethanol 75% RNase free
- Centrifugeuse à 4°C
- Spectrophotomètre Bio Photometer (Eppendorf)

12. 1. 1. 2. Méthode

Les milieux des boîtes sont décantés et les T75 sont placées sur glace. La lyse des cellules a lieu dans 600 µl de tampon de dénaturation par boîte. Les cellules sont ainsi lysées et raclées avant d'être collectées dans des microtubes à 4°C. 60 µl d'acétate de sodium 2M sont ajoutés à chaque microtube puis ceux-ci sont vortexés. 600 µl de chloroforme/phénol/isoamylalccol sont ajoutés (phase inférieure) et le tout est vortexé jusqu'à homogénéisation. Les microtubes sont placés sur glace pendant 15 minutes et les lysats sont ensuite centrifugés à 10.000 g à 4°C pendant 15 minutes. La phase aqueuse (phase supérieure) est délicatement récupérée et transférée dans de nouveaux microtubes. 600 µl d'isopropanol sont ajoutés à température ambiante. Les solutions sont mélangées par plusieurs inversions et ensuite placées à -20°C pendant minimum 15 minutes pour permettre la précipitation de l'ARN. Celui-ci est culoté par centrifugation à 13.000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont décantés délicatement par inversion et les culots sont resuspendus dans 1ml d'éthanol 75% RNase free refroidi à 4°C avant d'être centrifugés une dernière fois à la 13.000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont jetés et les culots sont laissés à sécher à température ambiante pendant 5 minutes (les culots secs deviennent transparents). Les culots sont finalement resuspendus dans 25 µl d'eau RNase free et dosés (Bio Photometer Eppendorf). L'ARN est conservé à -70°C.

12. 1. 2. « TRI Reagent Solution »

12. 1. 2. 1. Matériel

- TRI Reagent Solution (Applied Biosystems, AM9738)
- Chloroforme RNase free
- Isopropanol RNase free
- Eau auto-clavée 2 fois RNase free
- Ethanol 75% RNase free
- Centrifugeuse à 4°C
- Spectrophotomètre BioPhotometer (Eppendorf)

12. 1. 2. 2. Méthode

Les milieux des boîtes sont décantés et les T75 sont placées sur glace. La lyse des cellules a lieu dans 1 ml TRI Reagent Solution par boîte. Les cellules sont ainsi lysées et racless avant d'être collectées dans des microtubes à 4°C et incubées 5 minutes à température ambiante. 200 µl de chloroforme RNase free sont ajoutés et la solution est mélangée vigoureusement à la main pendant 15 minutes. Après une incubation de 5 à 15 minutes à température ambiante, les lysats sont centrifugés 15 minutes à 12.000 g et à 4°C pour séparer les phases. La phase supérieure est récupérée dans de nouveaux microtubes, 500µl d'isopropanol RNase free sont ajoutés et les mélanges sont homogénéisés puis laissés incubés 10 minutes à température ambiante. L'ARN est culoté par centrifugation à 12.000 g pendant 10 minutes et à 4°C. Les surnageants sont décantés délicatement et les culots sont resuspendus dans 1ml d'éthanol 75% RNase free refroidi à 4°C. Les suspensions sont vortexées à faible vitesse avant d'être centrifugées une dernière fois à la 7.600 g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants sont décantés prudemment et les culots sont laissés à sécher à température ambiante pendant 10 à 15 minutes (les culots secs deviennent transparents). Les culots sont par après resuspendus dans 100 µl d'eau RNase free, placés 10 minutes à 55°C, resuspendus et finalement dosés (Bio Photometer Eppendorf). L'ARN est conservé à -70°C.

12. 2. Reverse transcription (RT)

Cette étape va permettre de synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN précédemment extrait.

12. 2. 1. Matériel

- RNasin Ribonuclease Inhibitor (40U/µl) (Promega)
- Ribonuclease H (Gibco BRL)
- Eau nuclease free (Promega PI 19C)
- Oligo (dT) (12-18) (Gibco BRL)
- Mélange de dNTP (Eurogentec)
- SuperScript II (200 U/µl) (Invitrogen, USA)
- Extraits d'ARN total
- Eau RNase free
- Tampon de rétrotranscription 5x (Promega)
- Dithiotréitol (DTT) 0,1M (Promega)

12. 2. 2. Méthode

Pour chaque condition, 2 µg d'ARN total sont mélangés à 2 µl d'oligo dT. Le volume est porté à 9,5µl avec de l'eau nuclease free. Le mix est ensuite incubé 10 minutes à 70°C afin de permettre l'hybridation de l'oligo dT sur la queue poly-A des ARNm, et placé sur glace pendant 5 minutes. 9 µl du mix de réaction (Tableau II.8.) sont ajoutés et les échantillons sont

incubés 5 min à température ambiante. Après l'addition de 1,5 µl de SuperScript II, les microtubes sont incubés 90 minutes à 42°C, permettant une activité optimale de la Reverse Transcriptase, et ensuite 15 minutes à 70°C pour l'inactiver. Pour terminer, 1 µl de Ribonuclease H, dégradant les ARNm ayant servi de templates, est ajouté. Les échantillons sont incubés 20 minutes à 37°C afin de dégrader l'ARNr et l'ARNt formant des structures doubles brins et la composante ARN des hybrides ADNc/ARNm. L'ADNc est finalement congelé à -20°C.

12. 3. PCR en temps réel

La PCR en temps réel va permettre d'amplifier les ADNc néo-synthétisés tout en suivant l'amplification en temps réel grâce à l'incorporation d'un fluorochrome, le SYBR Green, dans les amplicons.

12. 3. 1. Matériel

- ADNc obtenu par transcription inverse
- Amorces sens et anti-sens des house-keeping genes et des gènes d'intérêt (Tableau II.9.)
- Sybr Green (Applied Biosystems, UK)
- Eau distillée
- Appareil PCR Science I 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems)

12. 3. 2. Méthode

L'ADNc est dilué 100x dans de l'eau distillée. Un mélange réactionnel est également préparé pour chaque gène d'intérêt et house keeping gene étudié (Tableau 9). 5 µl d'ADNc dilués sont déposés dans chaque puits, chaque condition étant réalisée en double. Les mix PCR des gènes d'intérêt sont également disposés dans les puits. Des blancs sont également préparés en remplaçant l'ADNc par de l'eau distillée. La plaque est ensuite recouverte d'un transparent autocollant, centrifugée brièvement et placée dans la machine. Une courbe de dissociation est réalisée en fin d'amplification afin de s'assurer de la spécificité des amorces utilisées. Les « fold inductions » sont calculés pour chaque condition selon la série de calculs suivants :

- a) La moyenne des Ct est calculée pour chaque condition et chaque gène
- b) La moyenne des Ct obtenus pour le "house keeping gene" pour chaque condition est soustraite à la moyenne obtenue pour le gène d'intérêt de la condition correspondante (Delta Ct).
- c) Le Delta Ct de la condition contrôle est soustrait au Delta Ct des autres conditions (Delta Delta Ct).
- d) Le fold induction de chaque condition est finalement obtenu après avoir effectué le calcul : $2^{(-\text{Delta Delta Ct})}$.

13. Dosage de l'expression de MCP-1 par ELISA

Nous allons tenter de mettre en évidence la modulation de l'expression d'une molécule chémoattractante, le MCP-1, produite par des HVSMCs stimulées avec les différents modulateurs du récepteur TP.

13. 1. Matériel

- Plaque 24 puits (Costar, USA)
- Etalon BSA (1 mg/ml)
- Solution de NaOH 1 N
- Solution de NaOH 0,5 N
- PBS
- Solution A
- Folin dilué 2x dans eau stérile
- Spectrophotomètre
- Quantikine Human CCL2/MCP-1 (DCP00, R&D systems, Royaume-Uni) (Tableau II.10.)

13. 2. Méthode

13. 2. 1. Récupération du surnageant

Après la stimulation, les surnageants sont délicatement récupérés dans des micro-tubes. Chaque surnageant est aliquoté et congelé à -70°C pour effectuer ultérieurement le dosage du MCP-1.

13. 2. 2. Dosage des protéines par la méthode de Folin

Après avoir décanté complètement les différents puits de la plaque, les cellules sont rincées deux fois au PBS. 200 µl de NaOH 0,5 N sont ajoutés sur les cellules pour une incubation de 30 minutes à température ambiante. Un blanc (150 µl de NaOH 0,5 N) et plusieurs dilutions de l'étalon BSA sont préparés dans du NaOH 1 N.

Lors du dosage, 150 µl de chaque lysat sont placés dans un tube à Bradford. On ajoute ensuite 750 µl de solution A (de 30 secondes en 30 secondes) et le tube est agité puis laissé au repos pendant 15 minutes. 75 µl de Folin dilué 2x dans de l'eau distillée sont ajoutés (de 30 secondes en 30 secondes) à chaque condition. Les échantillons sont à nouveau agités et incubés pendant 30 minutes. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 740 nm (de 30 secondes en 30 secondes).

13. 2. 3. Dosage du MCP-1 sécrété par le kit R&D Systems Quantikine Human CCL2/MCP-1 (Tableau II.10.)

Les surnageants sont décongelés et centrifugés 3 minutes à 13.000 RPM afin d'éliminer toutes cellules flottantes ou débris cellulaires. Tout d'abord, il faut reconstituer le Standard MCP-1 avec 5 ml du diluant de calibration RD5L. Cette dilution produit une solution stock de 2000 pg/ml, qui nous servira à réaliser la droite d'étalonnage. Des dilutions de 2 en 2 de la solution stock du standard avec du diluant de calibration RD5L sont réalisées jusqu'à une concentration de 31,2 pg/ml.

Le dosage est réalisé dans une plaque 96 puits dont le fond a été traité avec un anticorps monoclonal spécifique du MCP-1. Les aliquots ainsi que les différentes dilutions du standard sont déposés à raison de 200 µl par puits. L'incubation a lieu pendant deux heures à RT. Les puits sont ensuite rincés trois fois avec 300 µl de la solution de rinçage diluée 25 fois dans de l'eau distillée. 200 µl de solution de conjugué comprenant un anticorps polyclonal spécifique de MCP-1 et couplé à une peroxydase sont alors déposés dans chaque puits. L'incubation a lieu pendant une heure à température ambiante. Trois nouveaux rinçages sont alors effectués afin d'éliminer le conjugué-HRP non fixé. 200 µl de solution substrat sont déposés dans les puits et ceux-ci sont incubés à l'abri de la lumière et à RT pendant 20 minutes. Suite à l'action de l'enzyme, un produit de réaction coloré va apparaître. Cette

coloration va virer au jaune après l'ajout de 50 µl de solution stop. L'absorbance de chaque puits est alors mesurée à 450 nm. De plus, le lecteur de plaque, par une mesure duale (à 450 nm et 570 nm), permet d'éliminer les interférences dues aux imperfections de la plaque.

La droite d'étalonnage nous permettra ensuite de calculer la concentration en MCP-1 contenue dans nos échantillons incubés en présence des différents modulateurs du récepteur TP.

14. Test de prolifération cellulaire : le dosage MTT

Le dosage au MTT [bromure de 3-(4,5diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium] est à la base utilisé comme test de viabilité cellulaire. Nous allons l'utiliser ici comme test de prolifération. Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT, et le clivent en son dérivé formazan qui forme des cristaux de coloration mauve insolubles en milieu aqueux. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. La coloration du milieu nous donnera donc une idée de l'activité mitochondriale, et de manière indirecte la proportion de cellules présentes dans chaque puits.

14. 1. Matériel

- [bromure de 3-(4,5diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium] (Sigma)
- PBS
- solution de lyse: préparée à partir de 2 volumes de SDS 30 % (dilué dans de l'eau distillée et chauffé à 37°C) et d'un volume de N,N-diméthyl-formamide.
- Le pH de la solution est ensuite ajusté à 4,7
- Lecteur de plaque xMark microplate spectrophotometer (BioRad)

14. 2. Méthode

Le colorant MTT est préparé à une concentration de 2,5 mg/ml dans du PBS. Les cellules sont incubées en présence des molécules à tester dans une plaque 24 puits. Quand la stimulation est finie, on ajoute un mélange de 250 µl de milieu frais et 250 µl de solution de coloration. Les cellules sont ensuite incubées 2 heures dans l'étuve à 37°C (+5 % CO₂). Le surnageant est ensuite décanté et 500 µl de solution de lyse/puits sont ajoutés. On incube alors les plaques à 37°C avec une petite agitation (lyse et solubilisation des cristaux) pendant toute la nuit. Les plaques sont lues le lendemain à une longueur d'onde de 570 nm.

15. Effets des agonistes du récepteur TP sur la concentration cytosolique en calcium

15. 1. Matériel

- Solutions : Krebs-Hepes (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄.6H₂O 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 4,2 mM, CaCl₂.2H₂O 1,3 mM, de glucose 11,7 mM et de 10 mM d'Hepes, pH 7,4)
- Krebs-Hepes + BSA 0,5%
- Milieu de culture F12 + 10% de FBS
- Trypsine 0,5%-EDTA (Gibco, UK)
- PBS (Gibco, UK)
- Pluronic F-127 [4%] (Invitrogen, USA)
- Sonde Fura-2 AM (1 mM) (Invitrogen, USA)
- Triton X100 17,5% (Sigma, USA)
- EGTA 185 mM (Sigma, USA)

- Fluorimètre Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation, USA)
- Plaque 96 puits Microlite™ TCT (Termofischer, USA)

15. 2. Méthode

15. 2. 1. Préparation des cellules

Les boîtes de cultures (T75) à confluence sont rincées avec 10 ml de PBS. Les cellules sont ensuite détachées par ajout de 2,5 ml de Trypsine. Une fois les cellules détachées, on ajoute 10 ml de milieu de culture (+10% de FBS) afin de neutraliser la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1300 rpm pendant 5 minutes. Après avoir décanté le surnageant, les cellules sont resuspendues dans 10 ml de tampon Krebs-Hepes. Les cellules subissent à nouveau deux centrifugations et deux lavages. Les cellules sont ensuite incubées pendant 40 minutes dans un incubateur à 37°C avant d'être comptées et le tampon est renouvelé après une centrifugation de 5 minutes à 1300 rpm. Un mélange de la sonde fluorescente et de Pluronic F-127 [2%]_F en volume égal est réalisé et ajouté à la solution contenant les cellules. Les cellules sont à nouveau incubées à 37°C pendant 1 heure. La sonde fluorescente est finalement éliminée de la solution après 3 centrifugations à 1300 rpm durant 5 minutes. Le surnageant contenant la sonde est à chaque fois éliminé et remplacé par 10 ml de Krebs-Hepes (+BSA 0,5%) frais.

15. 2. 2. Mesure de la fluorescence émise suite à la mobilisation du calcium intracellulaire

150 µl de la solution contenant les cellules ($5 \cdot 10^5$ cellules/ml) chargées en sonde sont dispensés dans les puits d'une plaque 96 puits Microlite™ TCT, blanche et opaque. La fluorescence basale (F_{basal}) est mesurée. 10 µl de l'agoniste du récepteur TP testé sont ensuite ajoutés et la fluorescence ($F_{\text{stimulé}}$) est ensuite mesurée en continu jusqu'à obtenir une phase plateau. Les concentrations testées du U46619 vont de 10^{-3} M à 10^{-8} M, et de 10^{-2} M à 10^{-8} M pour le 8-*iso*-PGF_{2α}.

La normalisation des résultats se réalise après mesure de la fluorescence maximale (F_{max}) et de la fluorescence minimale (F_{min}). L'ajout de 10 µl de Triton X-100 17,5% permet la lyse des membranes cellulaires, libérant ainsi tout le calcium intracellulaire. La mesure du F_{max} se fait jusqu'à obtenir une phase plateau. Enfin, l'ajout de 10 µl d'EGTA 185 mM, un chelateur de calcium, permet la mesure du F_{min} . Les différents paramètres de fluorescence sont mesurés à deux longueurs d'onde d'excitation (340 et 380 nM). La longueur d'onde d'émission est dans les deux cas de 510 nM.

	Composition (pour 100 ml)
Tampon de lyse (0,2% NP-40)	10 ml HB 10x
	200 µl NP-40
	89,8 ml eau distillée
RE	10 ml HB 10x
	20 ml glycérol 87%
	70 ml eau distillée
SA	10 ml HB 10x
	20 ml glycérol 87%
	20 ml NaCl 4M
	50 ml eau distillée

	Composition
PIC (cocktail d'inhibiteurs de phosphatase)	Na ₃ VO ₄ 25 nM
	PNPP 250 nM
	β glycérophosphate 250 nM
	NaF 125 nM
PIB (cocktail d'inhibiteurs de protéase)	1 tablette (Complete protease inhibitor cocktail tablet 25X) diluée dans 1 ml d'eau

Tableau II.1. : composition des différentes solutions utilisées lors de l'extraction nucléaire.

Quantité	Réactifs	Composition
1 ml	Tampon de lyse 2X, pH 7,5	Tris 40 mM
		KCl 300 mM
		EDTA 2mM
20 µl	Triton X100 1%	Détergent neutre
580 µl	Eau distillée	
200 µl	PIC (cocktail d'inhibiteurs de phosphatase)	Na ₃ VO ₄ 25 nM
		PNPP 250 nM
		β-glycérophosphate 250 nM
		NaF 125 nM
200 µl	PIB (cocktail d'inhibiteurs de protéase)	1 tablette (Complete protease inhibitor cocktail tablet 25X) diluée dans 1 ml d'eau

Tableau II.2. : composition du tampon de lyse cellulaire 1x.

NFκB

Tampon de binding concentré	HEPES 10 mM
	KCl 300 mM
	Glycérol 20%
	Eau distillée pour mettre au volume
	pH 7,5
Tampon de lyse stock	HEPES 20 mM
	NaCl 350 mM
	MgCl ₂ 1 mM
	EDTA 0,5 mM
	EGTA 0,1 mM
	Glycérol 20%
	NP-40 1%
	pH 7,5

Tampon de binding complet 1x

Quantité	Réactifs
1 ml	Tampon de binding concentré
500 µl	BSA 5%
500 µl	DSS 0,05 mg/ml
500 µl	eau distillée
5 µl	DTT 1 M

Tampon de lyse complet

Quantité	Réactifs
2 ml	Tampon de lyse stock
10 µl	DTT 1 M
80 µl	PIC

AP-1

Tampon de binding 3x concentré	HEPES 6 mM
	EDTA 0,6 mM
	NaCl 24 mM
	Glycérol 36%
	Eau distillée pour mettre au volume
	pH 7,9

Tampon de binding complet 1x

Quantité	Réactifs
800 µl	Tampon de binding 3x concentré
8 µl	PolydIC 0,05 µg/µl
1352 µl	eau distillée
240 µl	DTT 10 mM

Tampon de lyse

Quantité	Réactifs
1 ml	Tampon RE
1 ml	Tampon SA
2 µl	DTT 1 M
80 µl	PIC
80 µl	PIB

Tableau II.3. : composition des différents tampons utilisés pour la mesure de l'activité de liaison à l'ADN de NFκB et AP-1.

Anticorps primaires	Référence	Dilution
Anti-VCAM-1 humain	CD106; R&D systems	100x
Anti-ICAM-1 humain	CD54; R&D systems	100x
Anti-c-Jun (H-79) (lapin)	sc1694; Santa Cruz Biotechnology	100x
Anti- α -Actin Smooth Muscle Actin (souris)	A 2547; Sigma	100x
Anti-p-65 (C-20)	sc-372; Santa Cruz Biotechnology	100x

Anticorps secondaires	Dilution
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG conjugate (Molecular Probes)	500x
Alexa Fluor 488 goat antirabbit IgG conjugate (Molecular Probes)	500x

Tableaux II.4. et II.5. : anticorps primaires et secondaires utilisés lors des immunomarquages.

Gel Buffer	
Pour 200 ml	0,8 g de SDS
	36,3 g de TRIS
	pH 8,9

Gel mix	
Pour 1 gel	8,4 ml Gel Buffer
	14 ml Acryl/bis
	12,6 eau distillée

Gel séparateur	
Pour 1 gel	35 ml du Gel Mix
	175 µl APS 25%
	10,5 µl de TEMED

Running Buffer 10x	
Pour 1 litre	63,2 g de TRIS
	10 g SDS
	40 g glycine

Blotting Buffer	
Pour 5 litres	24 g de TRIS
	115 g glycine
	1 litre méthanol

TBS 10x	
Pour 1 litre	24,22 g TRIS
	80,06 g NaCl
	pH 7,5

TBS-Tween 0,1%	
Pour 1 litre	100 ml TBS 10x
	1 ml de Tween20
	900 µl eau distillée

Solution de Blocking	
Pour 100 ml	TBS-T 1x
	2 g Blocking Agent

Spacer Gel Buffer	
Pour 100 ml	0,4 g de SDS
	5,1 g de TRIS
	pH 6,8

Spacer Gel Mix	
Pour 1 gel	2,5 ml de Spacer Gel Buffer
	1,67 ml Acryl/bis
	5,83 ml eau distillée

Gel concentrateur	
Pour 1 gel	10 ml du Spacer Gel Mix
	50 µl APS 25%
	3 µl TEMED

Bleu de charge 5x	
	10 ml Spacer Gel Buffer
	10 ml SDS 20%
	5 ml β-mercaptoéthanol
	10 ml glycérol
	17,5 mg bleu de bromophénol

Tableau II.6. : composition des différentes solutions utilisées lors de la réalisation d'un Western Blot.

Anticorps primaire	Référence	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Anti-VCAM-1	CD106; R&D systems	5.000x	Anti-souris couplé à la peroxydase (Amersham)	200.000x
Anti-récepteur au thromboxane A2	10004452; Cayman	5.000x	Anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham)	200.000x
Anti-c-Jun (H-79) (lapin)	sc1694; Santa Cruz Biotechnology	5.000x	Anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham)	200.000x
Anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	9251; Cell Signaling Technology	5.000x	Anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham)	200.000x
Anti-phospho-HSP27 (Ser82)	07-646; Upstate	5.000x	Anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham)	200.000x
anti- α -tubulin	NeoMarkers	30.000x	Anti-souris couplé à la peroxydase (Amersham)	400.000x
Anti-phospho-IKB- α (Ser 32) (14D4)	2859; Cell Signaling Technology	5.000x	Anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham)	200.000x
Anti-IKB- α (C-21)	sc371; Santa Cruz Biotechnology	5.000x	Anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham)	200.000x

Tableau II.7.: anticorps primaires et secondaires utilisés lors des expériences de Western Blot.

Quantité	Réactifs
4 µl	Buffer RT 5x
2 µl	DTT 0,1 M
1 µl	RNAsin (40U/µl)
2 µl	dNTP mix

Tableau II.8. : composition du mix de réaction.

Gènes	Forward/Reverse	Primers
Il-8	F	TTG ATA CTC CCA GTC TTG TCA TTG C
	R	TGA CTG TGG AGT TTT GGC TGT TT
Il-1	F	CTT AAA GCC CGC CTG ACA GA
	R	AAT AGG GAA GCG GTT GCT CAT
MCP-1	F	CAT TGT GGC CAA GGA GAT CTG
	R	AGT GAG TGT TCA AGT CTT CGG AGT T
VCAM-1	F	TTG GCT CAC AAT TAA GAA GTT TAA CAC
	R	GCA GGT ATT ATT AAG GAG GAT GCA A
23 kD	F	GCC TAC AAG AAA GTT TGC CTA TCT G
	R	TGA GCT GTT TCT TCT TCC GGT AGT
Il-6	F	TGG CTG CAG GAC ATG ACA A
	R	CCA TGC TAC ATT TGC CGA AGA
ICAM-1	F	GGA GCT TCG TGT CCT GTA TGG
	R	ACA TTG GAG TCT GCT GGG AAT T
Cox-2	F	ATT AGC CTG AAT GTG CCA TAA GAC T
	R	ACC CAC AGT GCT TGA CAC AGA AT
c-Jun	F	GGA TCA AGG CGG AGA GGA A
	R	TCC AGC CGG GCG ATT
TPPr α	F	GAC CCT GAA TTT GAC CTA CTT GCT
	R	CCG TTC ACA TTC AAT CCT TTC TG
TPPr β	F	CCG AGC AGC TGG GAT TAC AG
	R	TCA AAT TCA GGG TCA AAG AGC AT
Tubuline	F	CCC GAG GGC ACT ACA CCA T
	R	CAG GGA GGT GAA CCC AGA AC

Tableau II.9.: séquences des différents primers utilisés dans les expériences de PCR en temps réel.

Plaque 96 puits coaté avec un anticorps monoclonal murin anti-MCP-1 humain
Conjugué MCP-I : anticorps polyclonal anti-MCP-1, conjugué à une HRP
Solution standard de MCP-1
Diluant de calibration RD5L concentré 5 fois
Solution de rinçage concentrée 25 fois
Réactif de coloration A : peroxide d'hydrogène
Réactif de coloration B : tétraméthylbenzidine
Solution stop: acide sulfurique

Tableau II.10. : solutions contenues dans le kit « Quantikine Human CCL2/MCP-1 » (DCP00, R&D systems, Royaume-Uni).

III. Résultats

1. Caractérisation des cellules musculaires lisses vasculaires humaines (HVSMCs)

1.1. Expression de l'isoforme α de l'actine

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont un type particulier de cellules musculaires qui composent la majorité des parois des vaisseaux sanguins. Ce sont des cellules allongées (25 à 50 μm de long et environ 5 μm de diamètre) et mononuclées. Elles peuvent se contracter ou se relaxer, permettant de changer le diamètre des vaisseaux sanguins, et de cette façon, influencer directement la pression sanguine locale. Cette propriété est rendue possible grâce à l'expression de protéines contractiles.

Les protéines contractiles sont les composants majoritaires et les marqueurs de l'état de différenciation des cellules musculaires lisses (CMLs). Elles sont assemblées en myofilaments épais de myosine et en myofilaments fins, composés d' α -actine et de α -tropomyosine. L'actine est le composant majeur du cytosquelette des cellules eucaryotes. L'isoforme α est la protéine majoritaire chez les CML matures, et peut représenter jusqu'à 75% des différentes isoformes d'actine présentes chez les CMLs et 40% des protéines totales (Toussaint *et al.*, 2003).

Afin de s'assurer de la spécificité, de la qualité et de la maturation des cellules musculaires lisses humaines utilisées dans ce travail, une mise en évidence de l'isoforme α de l'actine par immunomarquage a été réalisée. Des cellules endothéliales EAhy926, n'ayant aucun phénotype contractile, ont été utilisées comme contrôle négatif.

Le marquage fluorescent montre un réseau dense et organisé de filaments d'actine au sein des HVSMCs (Figure III.1.). L'abondance de la protéine dans l'espace cellulaire démontre le caractère différencié des cellules employées. L'isoforme α de l'actine est présente dans les EAhy926, mais dans une moindre mesure. De plus, aucune organisation en réseau n'est observée.

1.2. Expression du récepteur au thromboxane A_2 dans les HVSMCs

Avant d'étudier le(s) effet(s) potentiel(s) d'agonistes et d'antagonistes spécifiques du récepteur TP sur les HVSMCs, nous devons nous assurer que ce récepteur est bien exprimé dans ces cellules. Une étude antérieure a montré que les cellules EAhy926 n'exprimaient pas le récepteur TP, bien qu'on le retrouve dans les cellules HUVECs dont elles dérivent. Les cellules EAhy926 ont donc été utilisées comme contrôle négatif.

Une vérification de la présence du récepteur TP au moyen d'un anticorps reconnaissant les deux isoformes a donc été réalisée par western blot. Les résultats montrent clairement une bande d'un poids moléculaire apparent de 55kDa dans les extraits de cellules musculaires lisses (Figure III.2.). Une bande nettement moins intense est détectée pour les EAhy926. Les résultats indiquent que les HVSMCs expriment bien le récepteur TP.

Les transcrits du gène du récepteur TP ont une caractéristique importante : ils ne sont pas issus uniquement d'exons, mais aussi d'introns. Après une analyse minutieuse de la séquence des ARNm des deux isoformes du récepteur TP, des amorces pouvant s'hybrider spécifiquement avec l'ADNc de l'ARNm du récepteur TP α ou de TP β . Une quantification de l'ARNm des deux isoformes du récepteur TP présents dans les cellules HVSMCs et EAhy926 a ensuite été réalisée.

Les résultats de la PCR quantitative montrent que les HVSMCs expriment les deux isoformes du récepteur TP. L'abondance des ARNm des récepteurs TP α ou TP β est d'environ 6 fois supérieure à l'abondance de l'ARNm de ces isoformes mesurée dans les EAhy926 (Figure III.3.).

1. 3. Mesure de la fluorescence émise lors de la mobilisation cytosolique du calcium

Maintenant que nous avons montré que les HVSMCs exprimaient bien le récepteur TP, nous devons nous assurer que ce récepteur est bien fonctionnel. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la stimulation du récepteur TP induit l'activation de la PLC et la libération par celle-ci d'un messager secondaire, l'IP₃. Ce dernier va agir sur son propre récepteur au niveau du réticulum endoplasmique lisse et induire la libération des ions Ca²⁺ stockés dans le réticulum dans le cytosol.

Le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} sont deux agonistes du récepteur TP ; ils devraient donc déclencher une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Une courbe dose-réponse a été réalisée pour chaque agoniste, avec une exposition des cellules à des concentrations croissantes allant de 10⁻⁹ à 10⁻³ M. Pour observer ce phénomène, la sonde fluorescente *Fura2 AM* a été utilisée. Cette sonde est capable de s'associer aux ions Ca²⁺ ; elle émet alors une fluorescence à 520 nm.

Si le récepteur TP s'avère fonctionnel, la courbe obtenue pour chaque agoniste nous permettra de définir une concentration à laquelle chaque agoniste sera utilisé dans la suite du travail.

1. 3. 1. Effet du U46619

Une courbe à l'allure sigmoïde est obtenue, démontrant d'une part que le récepteur TP est fonctionnel dans les HVSMCs et d'autre part qu'il réagit à la présence du U46619 dans le milieu. Aucune augmentation de la fluorescence n'est visible pour des concentrations inférieures à 10⁻⁷ M. A partir d'une concentration de 10⁻⁷ M, la fluorescence augmente et atteint un seuil à 10⁻⁵ M (Figure III.4.A.)

1. 3. 2. Effet du 8-*iso*-PGF_{2 α}

Une courbe à l'allure sigmoïde est également obtenue, confirmant que le récepteur TP est fonctionnel et qu'il réagit à la présence du 8-*iso*-PGF_{2 α} dans le milieu. Aucune augmentation de la fluorescence n'est visible pour des concentrations inférieures à 10⁻⁶ M. A partir d'une concentration de 10⁻⁶ M, la fluorescence augmente et atteint un seuil à 10⁻³ M (Figure III.4.B.).

Nous avons choisi d'utiliser une concentration de 1 μM en U46619 et 50 μM en 8-*iso*-PGF_{2 α} . Ces concentrations correspondent approximativement à l'EC₅₀ de chaque agoniste. L'EC₅₀ est défini comme étant la concentration en agoniste induisant 50% de la mobilisation du calcium intracellulaire maximale.

1. 4. Etude de l'effet des modulateurs du récepteur TP sur la prolifération des HVSMCs

Les résultats des expériences précédentes montrent que les HVSMCs expriment le récepteur TP et que la stimulation de celui-ci par deux agonistes différents conduit à la production de messagers secondaires induisant une réponse dans les cellules. Parmi les réponses physiologiques décrites pour les cellules endothéliales, on retrouve la prolifération cellulaire. Nous avons donc voulu savoir si cet effet était également présent dans les HVSMCs.

Les cellules ont été stimulées en présence de U46619 à une concentration de 1 μM ou de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μM . Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μM et sont incubés une heure avant les agonistes. La stimulation a lieu pendant quatre jours, et le milieu a été changé après les deux premiers jours d'incubation. Afin de mettre en évidence un éventuel effet mitogène des agonistes, les cellules ont été incubées dans un milieu contenant 0,5 % de sérum.

Les résultats ne montrent aucune augmentation de la prolifération dans les différentes conditions testées. Au contraire, un ralentissement de la prolifération de près de 15% a été observé pour les cellules incubées en présence de 8-*iso*-PGF_{2 α} , même lorsque celui-ci est associé à un des deux antagonistes (Figure III.5.).

1. 5. Effets des agonistes et des antagonistes sur l'abondance de l'ARNm des récepteurs TP α et TP β

Avant d'entamer l'étude des effets des modulateurs du récepteur TP sur l'expression des molécules d'adhérence, nous avons voulu vérifier si les molécules utilisées influençaient l'expression des isoformes de ce récepteur.

L'abondance des transcrits a ainsi été déterminée après 6h et 16h d'incubation avec les différentes molécules d'intérêt.

Nous avons utilisé le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} comme agonistes et le SQ29548 et le BM-520 comme antagonistes. L'IL-1 β n'agit pas directement sur le récepteur TP, mais active la voie NF-kB. Il est utilisé comme contrôle positif de l'induction de l'expression de VCAM-1 et ICAM-1.

Les cellules ont été incubées en présence de U46619 à une concentration de 1 μM , de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μM et/ou d'IL-1 β (3 ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μM et sont pré-incubés une heure avant l'incubation en présence des agonistes.

1. 5. 1. Incubation de 6 heures

Une diminution de la quantité d'ARNm présent dans les cellules est observée, et ceci pour les deux isoformes du récepteur TP et quelles que soient les conditions de stimulation. Les agonistes induisent une légère diminution. L'IL-1 β a un effet plus marqué et un léger effet synergique est observé lorsqu'il est couplé à un des deux agonistes, avec un effet plus prononcé pour le U46619. La présence des antagonistes permet de réduire légèrement la répression des transcrits, avec un effet plus marqué sur l'ARNm du récepteur TP β . Le BM-520 possède un effet antagoniste plus puissant que le SQ29548 (Figures III.6.A. et III.7.A.).

1. 5. 2. Incubation de 16 heures

Le profil d'expression des deux isoformes du récepteur TP pour les cellules incubées pendant 16 heures en présence des différentes molécules est semblable à celui des cellules incubées pendant 6 heures. Le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} ne diminuent que très légèrement la quantité de transcrits du récepteur TP α ou du TP β . L'IL-1 β engendre à nouveau une diminution du niveau d'ARNm des deux isoformes de 50 à 60 %, sans que les agonistes ou antagonistes n'aient d'influence sur cette diminution (Figure III.6.B. et III.7.B.).

2. Etude des effets des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de VCAM-1 et ICAM-1

2. 1. Effets des modulateurs du récepteur TP sur l'activation des voies JNK et p38

2. 1. 1. Effets du U46619 et du 8-*iso*-PGF_{2α} sur les phosphorylations de JNK et p38

L'activation du récepteur TP peut déclencher plusieurs voies de signalisation connues pour influencer l'expression des molécules d'adhérence. Bayat *et al.* ont montré que les voies p38 et JNK en faisaient partie (Bayat *et al.*, 2008). Afin de mettre en évidence une activation éventuelle de ces deux voies dans la signalisation chez les HVSMCs, les phosphorylations de JNK et de HSP27, un substrat direct de p38, ont été étudiées.

2. 1. 1. 1. Effet du U46619

Afin de suivre l'activation de ces deux voies de signalisation, les cellules ont été stimulées pendant 5, 10, 15, 20 et 30 minutes avec le U46619 seul ou combiné à l'IL-1β. Des extraits de cellules contrôles et stimulées pendant 15 minutes à l'IL-1β ont également été utilisés. Les formes phosphorylées des protéines d'intérêt ont été détectées par western blot.

Le U46619 est capable d'induire une phosphorylation à la fois de JNK et HSP27. Une augmentation de la phosphorylation de ces deux protéines est observée, dont l'intensité augmente avec le temps de stimulation. L'IL-β semble activer la voie de la JNK mais pas celle de p38. De plus, un effet synergique est observé lorsque les cellules sont incubées avec les deux molécules simultanément, et ceci pour les deux voies de signalisation (Figure III.8.).

2. 1. 1. 2. Effet du 8-*iso*-PGF_{2α}

Une deuxième expérience a été réalisée pour observer l'effet du deuxième agoniste, le 8-*iso*-PGF_{2α}. Les cellules ont donc été stimulées pendant 5, 10, 15, 20 et 30 minutes avec le 8-*iso*-PGF_{2α} seul ou combiné à l'IL-1β. Des extraits de cellules contrôles et stimulées pendant 15 minutes à l'IL-β ont également été utilisés.

Les résultats obtenus sont différents de ceux obtenus pour le U46619. En effet, le 8-*iso*-PGF_{2α} seul n'est pas capable de déclencher la phosphorylation de JNK. L'association des deux molécules n'entraîne pas un effet synergique mais atteint, à partir de 15 minutes, un niveau comparable à celui obtenu en présence d'IL-β seule (Figure III.9.).

2. 1. 2. Effets du SQ29548 et du BM-520 sur l'activation des voies de JNK et p38

Les résultats des deux expériences précédentes ont montré une phosphorylation maximale de JNK et HSP27 à partir de 20 minutes. C'est donc ce temps qui a été retenu pour tester les effets potentiels des antagonistes sur des cellules stimulées en présence de U46619, de l'IL-1β ou des deux molécules simultanément.

Une phosphorylation de JNK et de HSP-27 est observée dans toutes les cellules stimulées avec de l'IL-1 β , et l'effet synergique du U46619 et de l'IL-1 β observé précédemment est également retrouvé. Les antagonistes seuls ou couplés au U46619 ne déclenchent pas la phosphorylation de JNK ou de HSP27. Cependant, aucune bande n'apparaît pour les cellules qui ont été traitées au U46619 seul. L'explication de ce résultat provient probablement d'un temps de révélation plus court que pour l'étude du U46619 sur les phosphorylations de JNK et HSP27 (Figure III.10.). Etant donné que les antagonistes n'exercent aucun effet sur la phosphorylation de JNK et HSP27 induite par l'IL-1 β et qu'il est assez difficile d'observer la présence de p-JNK et p-HSP27 dans des extraits de cellules stimulées au 8-*iso*-PGF_{2 α} , une expérience similaire utilisant le 8-*iso*-PGF_{2 α} à la place du U46619 n'a pas été réalisée.

Ces différents résultats montrent que les agonistes du récepteur TP activent les voies JNK et p38 sans et que les antagonistes n'ont aucune influence sur ce processus.

2. 2. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'activité de AP-1

Les facteurs de transcription NF-kB et AP-1 sont impliqués dans la transcription de VCAM-1. Bayat *et al.* ont montré que l'activation du récepteur TP pouvait augmenter l'expression de VCAM-1 induite par l'IL-1 β chez des VSMCs de rats via la voie de signalisation JNK (Bayat *et al.*, 2008). Les résultats décrits précédemment montrent que le U46619 est effectivement capable d'activer cette voie. Cette dernière est impliquée dans l'activation de AP-1. Ce facteur de transcription est composé de deux protéines: c-Jun et c-Fos.

Lors de cette étude, les cellules ont été stimulées en présence de U46619 à une concentration de 1 μ M, de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μ M et/ou d'IL-1 β (3 ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μ M. Les temps de stimulation varient selon le processus que l'on désire mettre en évidence, mais les antagonistes sont toujours pré-incubés une heure avant d'ajouter les agonistes.

2. 2. 1. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de c-Jun

L'étude de l'expression de l'ARNm de c-Jun ne montre aucune augmentation de celle-ci dans aucune des conditions testées et ceci après 16 heures d'incubation. Au contraire, une très légère répression est observée, en particulier dans les cellules incubées avec de l'IL-1 β (Figure III.11.).

2. 2. 2. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de c-Jun

L'abondance de c-Jun a ensuite été évaluée par western blot. Les intensités des bandes obtenues ne varient pas ou peu. Ces résultats suggèrent que l'IL-1 β et les modulateurs du récepteur TP n'influencent pas l'abondance de la protéine c-Jun après 16 heures d'incubation (Figure III.12.).

2. 2. 3. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur la localisation de c-Jun

Après 16 heures d'incubation, une accumulation nucléaire de c-Jun est visible après une stimulation en présence l'IL-1 β seule. Les deux agonistes pris individuellement ne semblent pas avoir d'effet marqué sur c-Jun, et la combinaison de ceux-ci avec l'IL-1 β ne permet pas d'augmenter la fluorescence nucléaire de façon significative. Les deux antagonistes n'exercent aucun effet sur l'expression induite par l'IL-1 β (Figure III.13.).

2. 2. 4. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1

Les modulateurs, agonistes ou antagonistes, semblent diminuer légèrement l'activité de liaison à l'ADN d'AP-1, tandis que l'IL-1 β l'augmente (Figure III.14.). Etant donné le peu de variations sont observées entre les données, nous ne pouvons conclure à un effet des modulateurs du récepteur TP sur l'activité de liaison à l'ADN d'AP-1.

3. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur la régulation de VCAM-1

Bayat *et al.* avaient montré que les agonistes du récepteur TP induisaient une augmentation de l'expression de VCAM-1 dans les VSMCs de rat (Bayat *et al.*, 2008). Nous avons voulu vérifier cet effet sur les VSMCs humaines.

3. 1. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de VCAM-1

Une analyse de l'abondance de l'ARNm de VCAM-1 a été réalisée afin d'observer des effets potentiels de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP au niveau transcriptomique. Cette analyse a été effectuée à deux temps d'incubation différents : 6 heures et 16 heures. Les cellules qui sont incubées en présence d'un antagoniste sont toujours incubées avec celui-ci une heure avant d'ajouter les agonistes.

3. 1. 1. Incubation de 6 heures

Après 6 heures de stimulation, une légère augmentation de l'abondance de l'ARNm de VCAM-1 est constatée pour le U46619 (6 fois), mais pas pour le 8-*iso*-PGF_{2 α} . L'IL-1 β induit une forte augmentation de l'abondance de l'ARNm de VCAM-1 probablement via la voie NF- κ B. L'association de l'IL-1 β avec un des deux agonistes induit, pour les deux molécules, une répression de l'augmentation de l'expression de l'ARNm de VCAM-1 induite par l'IL-1 β . Cette diminution de l'expression de l'ARNm de VCAM-1 est plus marquée lors de l'association de l'IL-1 β et du U46619 que de l'IL-1 β et du 8-*iso*-PGF_{2 α} . La présence des antagonistes, SQ29548 ou BM-520, permet de retrouver des niveaux d'induction de l'expression de l'ARNm proches de celui obtenu pour l'IL-1 β , indiquant qu'ils exercent bien leur effet d'antagonistes (Figure III.15.A.).

3. 1. 2. Incubation de 16 heures

Les deux agonistes seuls n'ont aucun effet sur l'expression de l'ARNm de VCAM-1. Comme attendu, l'IL-1 β entraîne une augmentation importante de l'abondance de l'ARNm de VCAM-1. L'association d'un des deux agonistes du récepteur TP avec l'IL-1 β provoque, quelque soit l'agoniste employé, une diminution de l'augmentation de l'abondance de l'ARNm induite par l'IL-1 β . La présence du SQ29548 ou du BM-520 permet de retrouver des niveaux d'induction de l'expression de l'ARNm proches de celui obtenu pour l'IL-1 β seule. Les niveaux d'induction après 16 heures d'incubation sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus après 6 heures d'incubation (Figure III.15.B.)

3. 2. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur la localisation de VCAM-1

L'abondance de VCAM-1 en surface des HVSMC a été estimée par immunofluorescence. Nous avons utilisé le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} comme agonistes et le SQ29548 et le BM-520 comme antagonistes. L'IL-1 β n'agit pas directement sur le récepteur TP, mais a la capacité d'induire l'expression de VCAM-1 via la voie NF κ B en se liant à son récepteur propre.

Les cellules ont été stimulées en présence de U46619 à une concentration de 1 et 5 μM , de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μM et/ou d'IL-1 β (3 ng/mL). L'antagoniste SQ29548 a été utilisé à une concentration de 1 μM et le BM-520 à une concentration de 0,1 et 1 μM . La stimulation a lieu pendant 16 heures, et les antagonistes sont pré-incubés une heure avant les agonistes.

Les photographies ont été prises au moyen d'un microscope confocal à fluorescence. La fluorescence bleue, provenant de l'agent intercalant To-Pro 3, indique l'emplacement des noyaux dans les cellules HVSMC. La fluorescence verte est émise par un fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire, et permet d'avoir une idée de l'abondance relative de VCAM-1 en surface de ces cellules. Les clichés sélectionnés n'illustrent qu'une partie de lame, mais sont représentatifs de l'état général des cellules stimulées ou non.

Les cellules non stimulées n'expriment pas constitutivement VCAM-1 à leur surface. Le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 1 μM ne permettent pas d'induire de fluorescence verte, signe que les deux agonistes n'ont aucun effet sur l'expression membranaire de VCAM-1. Une légère expression est cependant visible à 5 μM de U46619. L'IL-1 β induit quant à elle l'apparition de fluorescence, indicatrice d'une augmentation de l'abondance de VCAM-1. La combinaison de l'IL-1 β avec le U46619 ou le 8-*iso*-PGF_{2 α} n'entraîne aucune augmentation ni diminution de la fluorescence émise par rapport à l'IL-1 β seul. Le blocage du récepteur TP par un antagoniste, le SQ29548 ou le BM-520, n'influence pas non plus la surexpression de VCAM-1 induite par l'IL-1 β (Figure III.16.).

4. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'expression d'ICAM-1

Une étude similaire à la précédente a été effectuée pour suivre l'influence des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de la molécule d'adhérence ICAM-1. Nous avons testé l'IL-1 β et les différents modulateurs du récepteur TP sur l'expression d'ICAM-1 aux niveaux protéiques et ARNm.

4.1. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm d'ICAM-1

Une analyse quantitative de l'ARNm d'ICAM-1 a été réalisée afin d'observer des effets potentiels de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP au niveau transcriptomique. Les cellules ont été stimulées en présence de U46619 à une concentration de 1 μM , de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μM et/ou d'IL-1 β (3 ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μM . Cette analyse a été effectuée à deux temps d'incubation différents : 6 heures et 16 heures. Les cellules qui doivent être mises en présence des antagonistes sont toujours pré-incubées avec ceux-ci une heure avant d'ajouter les agonistes.

4.1.1. Incubation de 6 heures

Le 8-*iso*-PGF_{2 α} n'a pas d'influence sur l'expression de l'ARNm d'ICAM-1, et une augmentation (14 fois) est visible pour le U46619. L'IL-1 β induit une forte augmentation de l'abondance de l'ARNm. Son association avec un des deux agonistes induit, dans les deux cas, une augmentation du transcrit qui est cependant inférieure à celle obtenue pour l'IL-1 β

seule. La différence d'induction entre l'IL-1 β et la combinaison de celle-ci à un agoniste n'est néanmoins pas aussi importante que celle obtenue pour l'ARNm de VCAM-1. La présence des antagonistes, SQ29548 ou BM-520, permet de retrouver des niveaux d'induction de l'expression de l'ARNm d'ICAM-1 proches de celui obtenu pour l'IL-1 β seule (Figure III.17.A.).

4. 1. 2. Incubation de 16 heures

Après 16 heures d'incubation, les deux agonistes seuls n'ont aucun effet sur l'expression de l'ARNm d'ICAM-1. L'IL-1 β induit une augmentation de l'ARNm de ICAM-1 et son association avec un des deux agonistes induit, quel que soit l'agoniste, une augmentation de l'ARNm qui à nouveau est inférieure à celle obtenue pour l'IL-1 β seul. La présence du SQ29548 ou du BM-520 permet de retrouver des niveaux d'induction de l'expression de l'ARNm proches de celui obtenu pour l'IL-1 β seule. Les niveaux d'induction après 16 heures d'incubation sont beaucoup plus faibles qu'après 6 heures d'incubation (Figure III.17.B).

4. 2. Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur la localisation d'ICAM-1

Les cellules ont été stimulées en présence de U46619 à une concentration de 1 μ M, de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μ M et/ou d'IL-1 β (3 ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μ M. Les antagonistes sont toujours pré-incubés une heure avant d'ajouter les agonistes. La stimulation a lieu pendant 16 heures.

La localisation cellulaire par marquage fluorescent montre qu'ICAM-1 est exprimé constitutivement en surface des HVSMC. L'effet du U46619 n'a pas pu être déterminé, mais le deuxième agoniste, le 8-*iso*-PGF_{2 α} , ne semble pas augmenter l'expression constitutive d'ICAM-1. L'IL-1 β entraîne quant à elle une surexpression d'ICAM-1. Cette surexpression ne semble pas être affectée par la présence de U46619 ou de 8-*iso*-PGF_{2 α} . Les deux antagonistes n'entraînent aucune diminution de la surexpression induite par l'IL-1 β (Figure III.18).

5. Etude des effets des modulateurs du récepteur TP sur la voie NF-kB

Nous avons vu que les deux agonistes, le U46619 ou le 8-*iso*-PGF_{2 α} , semblaient induire une diminution de l'expression de l'ARNm de VCAM-1 mais aussi d'ICAM-1 (dans une moindre mesure) induite par l'IL-1 β . La voie NF-kB est connue pour être responsable de l'induction de l'expression de ces deux protéines en présence d'IL-1 β . Nous avons donc cherché si les deux agonistes étaient capables d'influencer d'une manière ou d'une autre la voie NF-kB. L'activation de la voie NF-kB entraîne la libération du dimère NF-kB de son inhibiteur, I-kB, suite à la dégradation de celui-ci. NF-kB transloque alors dans le noyau où il se lie à sa séquence consensus dans l'ADN et augmente la transcription de ces gènes cibles. Nous avons étudié l'influence des modulateurs du récepteur TP sur ces différentes étapes.

5. 1. Effets du U46619 sur la protéine I-kB α

Nous avons tout d'abord étudié si le U46619 pouvait influencer la dégradation de la protéine I-kB α induite par l'IL-1 β . Les cellules ont été stimulées pendant 5, 10, 15, 20 et 30 minutes avec le U46619 seul ou combiné à l'IL-1 β . Des extraits de cellules contrôles et stimulées pendant 15 minutes à l'IL-1 β ont également été utilisés.

La protéine I-kB α est bien présente dans les extraits de cellules non stimulées mais également dans les extraits de cellules stimulées au U46619 seul. Aucune diminution de l'intensité des bandes n'est visible après 30 minutes de stimulation. Le U46619 n'active donc pas la voie NF-kB, en tout cas, pour les temps d'incubation testés. Par contre, lorsqu'on incube les cellules avec de l'IL-1 β et du U46619, on constate une disparition progressive de la protéine dans les 10 minutes et une disparition totale à partir de 15 minutes. On peut également observer la forme phosphorylée de I-kB α qui apparaît. Elle est visible sous la forme d'une bande beaucoup plus claire juste au-dessus de celle d'I-kB α . p-I-kB α est seulement visible à 5 et 10 minutes. Le U46619 n'empêche pas la dégradation de I-kB α induite par l'IL-1 β (Figure III.19).

5. 2. Effets des modulateurs du récepteur TP sur la localisation subcellulaire de NF-kB

La localisation subcellulaire de p65, sous-unité majoritaire de NF-kB, a été étudiée afin d'observer une éventuelle translocation de NF-kB dans le noyau suite aux différentes stimulations.

Les cellules ont été incubées en présence de U46619 à une concentration de 1 μ M, de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μ M et d'IL-1 β (3 ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μ M et sont pré-incubés une heure avant les agonistes. La stimulation a lieu pendant 15 minutes.

Les agonistes et antagonistes, pris individuellement ou associés entre eux, n'induisent pas de translocation de NF-kB dans le noyau. L'IL-1 β , induit par contre une translocation nucléaire bien marquée de NF-kB (Figure III.20). Les différents modulateurs du récepteurs TP n'influencent pas la translocation nucléaire de p65 induite par l'IL-1 β .

5. 3. Effets des modulateurs du récepteur TP sur l'activité de liaison à l'ADN de NF-kB

Les cellules ont été incubées en présence de U46619 à une concentration de 1 μ M, de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μ M et à l'IL-1 β (3 ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μ M. La stimulation a lieu pendant 20 minutes, et les antagonistes sont pré-incubés une heure avant les agonistes.

Les agonistes ou les antagonistes seuls n'exercent aucun effet sur l'activité de liaison de NF-kB à sa séquence consensus d'ADN. L'IL-1 β permet quant à elle d'augmenter considérablement cette activité. L'association de l'IL-1 β avec un agoniste ou un antagoniste seuls ou combinés n'influence pas l'activité induite par l'IL-1 β . La même conclusion est à tirer concernant l'association des antagonistes avec l'IL-1 β et le U46619 (Figure III.21.).

5. 4. Effets des modulateurs du récepteur TP l'abondance de l'ARNm sur de gènes cibles de NF-kB

Nous avons voulu mettre en évidence l'effet potentiel des différents modulateurs du récepteur TP sur l'expression de quelques gènes cibles de NF-kB. L'abondance des transcrits des gènes IL-6, IL-8, MCP-1 et Cox-2 a ainsi été étudiée (Figure III.22.).

Les cellules ont été incubées en présence de U46619 à une concentration de 1 μ M, de 8-*iso*-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μ M et d'IL-1 β (3ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μ M et sont pré-incubés une heure avant les agonistes. L'incubation a lieu pendant 6 heures.

5. 4. 1. IL-8

Les agonistes induisent un effet positif sur l'expression de l'ARNm de l'IL-8. Le U46619 permet d'augmenter l'abondance de l'ARNm de 10 fois et le 8-*iso*-PGF_{2 α} de 3 fois. Une augmentation impressionnante de l'abondance du transcrit (10.000 à 15.000 fois) est observée dans toutes les autres conditions utilisant l'IL-1 β . L'association d'agonistes ou d'antagonistes dans le milieu de stimulation des cellules n'influence en rien la quantité d'ARNm induite par l'IL-1 β seule.

5. 4. 2. IL-6 et COX-2

Le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} ne semblent pas influencer de manière importante l'abondance de l'ARNm de l'IL-6 (6 et 2 fois) et de COX-2 (3 et 4 fois). L'IL-1 β , induit une nette augmentation du taux de transcrits. L'association de l'IL-1 β et du U46619 induit une augmentation beaucoup plus importante de l'abondance de l'ARNm. Cette augmentation ne se produit pas lorsque les cellules sont incubées en présence de l'IL- β et du 8-*iso*-PGF_{2 α} . Le SQ29548 et le BM-520 exercent leur effet antagoniste car on observe une diminution du niveau de transcrit induit par l'association de l'IL-1 β et du U46619, permettant d'obtenir une valeur proche de celle obtenue pour l'IL-1 β seule. Les inductions obtenues pour les deux conditions comprenant les antagonistes couplés à l'IL- β et combinée au 8-*iso*-PGF_{2 α} sont beaucoup plus importantes que celles observées en présence des antagonistes couplés à l'IL-1 β et au U46619. Ces valeurs, anormalement élevées devraient, en théorie, être équivalentes ou inférieures à la valeur obtenue pour l'association de l'IL-1 β et du 8-*iso*-PGF_{2 α} .

5. 4. 3. MCP-1

Les agonistes seuls induisent une augmentation de l'abondance de l'ARNm de MCP-1. Cette augmentation est plus visible dans les cellules stimulées en présence de U46619 (7 fois) ainsi que de 8-*iso*-PGF_{2 α} (3 fois). L'IL-1 β induit une augmentation du transcrit de près de 100 fois. L'association de l'IL-1 β avec le U46619 ou le 8-*iso*-PGF_{2 α} entraîne une légère diminution de l'augmentation de l'ARNm induite par l'IL-1 β . Cette dernière valeur est à nouveau atteinte lorsque les cellules sont incubées en présence de SQ29548 ou de BM-520 couplé à l'IL-1 β et à un des deux agonistes.

6. Evaluation de la sécrétion de la cytokine MCP-1

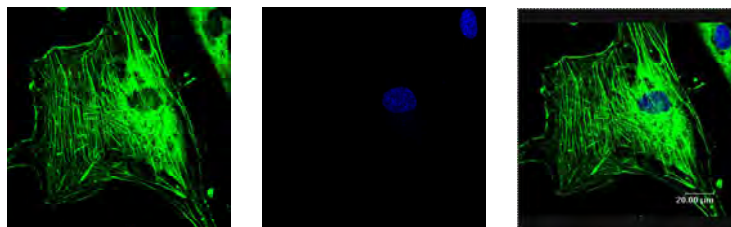
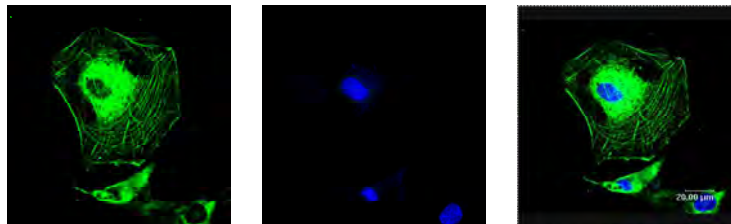
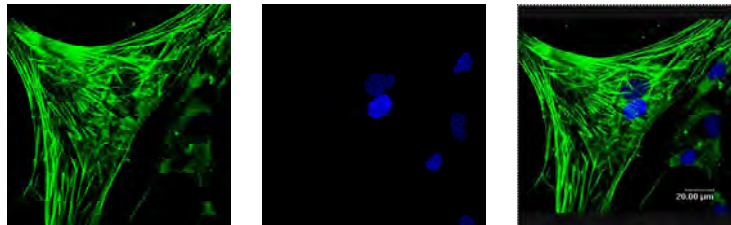
Parmi les gènes cibles de NF-kB, nous avons observé que les agonistes du récepteur TP induisaient l'expression de l'ARNm de MCP-1. Afin de vérifier si cet effet se répercutait

sur la synthèse de la protéine, la cytokine MCP-1 a été dosée dans les différents milieux de stimulation par ELISA (pg/ml) et la quantité totale de protéines (pg/ml) a été déterminée pour chaque condition après une stimulation de 6 heures. Ces deux données nous ont permis de calculer la quantité de MCP-1 libérée dans le milieu (pg/μg de protéines).

Les cellules ont été incubées en présence de U46619 à une concentration de 1 μM, de 8-*iso*-PGF_{2α} à une concentration de 50 μM et d'IL-1β (3 ng/mL). Les antagonistes SQ29548 et BM-520 ont été utilisés à une concentration de 1 μM et sont pré-incubés une heure avant les agonistes. L'incubation a lieu pendant 6 heures.

La sécrétion basale de MCP-1 dans les HVSMCs se situe aux alentours de 250 pg/μg de protéines pour 6 heures. Le U46619 entraîne une augmentation d'un facteur 7 du taux de MCP-1. Le 8-*iso*-PGF_{2α} induit quant à lui une augmentation de la sécrétion d'un facteur 3,2. Le SQ29548 et le BM-520 pris individuellement n'influencent pas la production de MCP-1 dans le milieu, mais permettent de diminuer considérablement la sécrétion de la cytokine induite par le U46619. La même observation est faite concernant l'influence des antagonistes sur l'induction par le 8-*iso*-PGF_{2α}. L'IL-1β entraîne une importante augmentation de la sécrétion de MCP-1, qui atteint près de 26000 pg/μg de protéines. Dans toutes les conditions comprenant de l'IL-1β, on retrouve une production de la cytokine aux alentours de 26000 pg/μg de protéines. Les différents agonistes et antagonistes n'ont donc pas d'effet sur la sécrétion de MCP-1 induite par l'IL-1β (Figures III.23 A. et B.).

Cellules musculaires lisses humaines



Cellules EAhy926

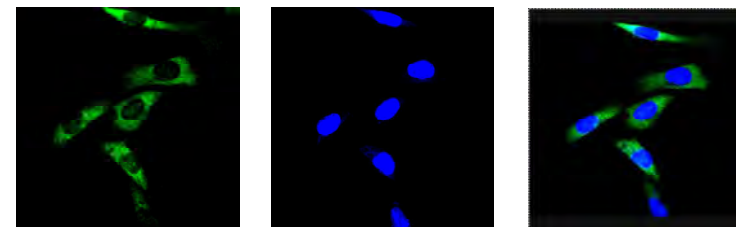
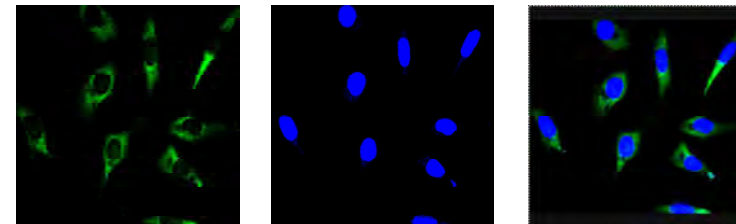
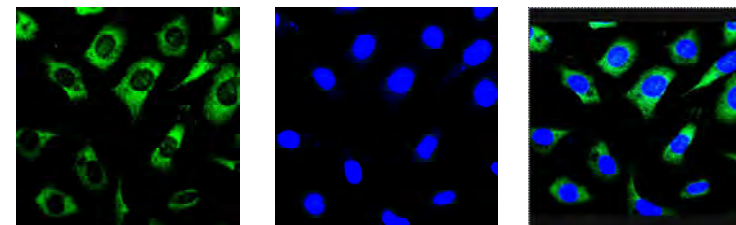
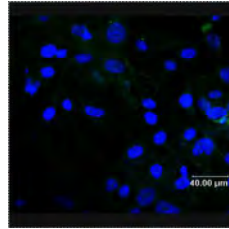
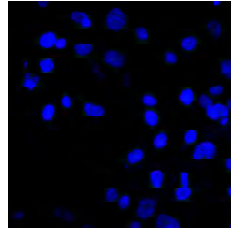
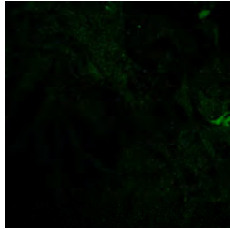


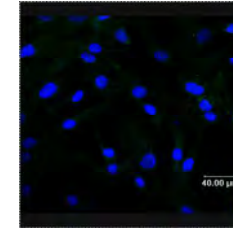
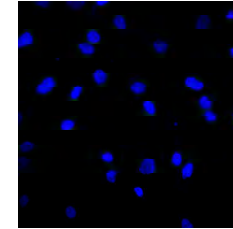
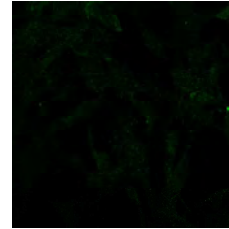
Figure III.1. : Expression de l'isoforme α de l'actine dans les cellules HVSMCs et EAhy926

Les cellules ont été fixées et perméabilisées et l'isoforme α de l'actine est marquée en vert grâce à un anticorps primaire qui lui est spécifique et à un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Le noyau des cellules apparaît en bleu suite au marquage par le To-Pro 3. Les images de gauche représentent la fluorescence émise dans le vert, celles du milieu la fluorescence émise dans le bleu et celles de droite la superposition des deux images.

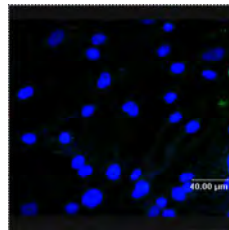
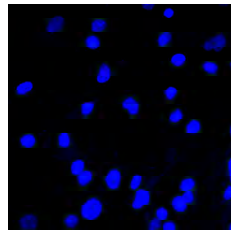
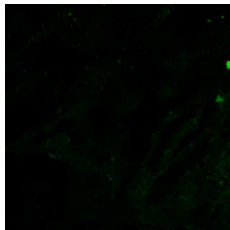
Contrôle



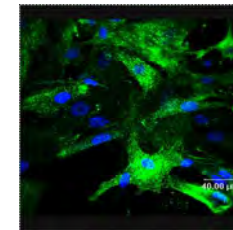
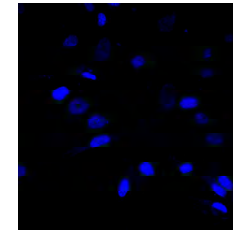
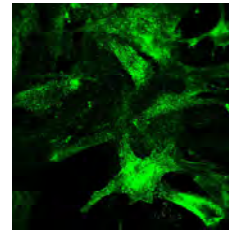
8-iso-PGF_{2α} (50 µM)



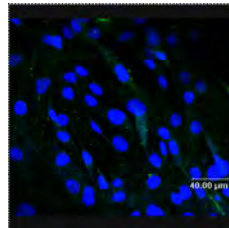
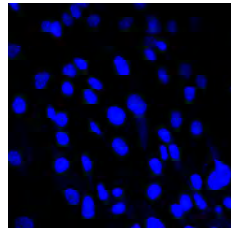
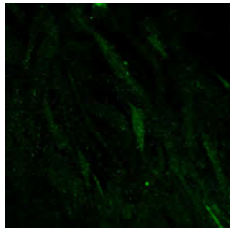
U466619 (1 µM)



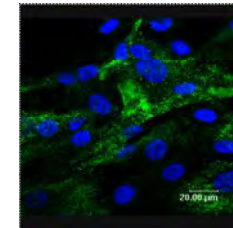
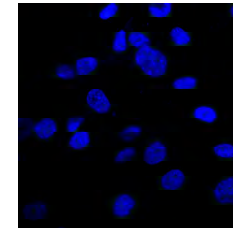
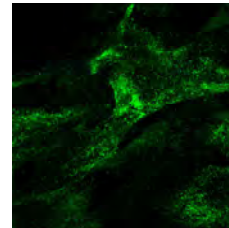
IL-1β (3 ng/ml)



U46619 (5 µM)



IL-1β (3 ng/ml) + U46619 (1 µM)



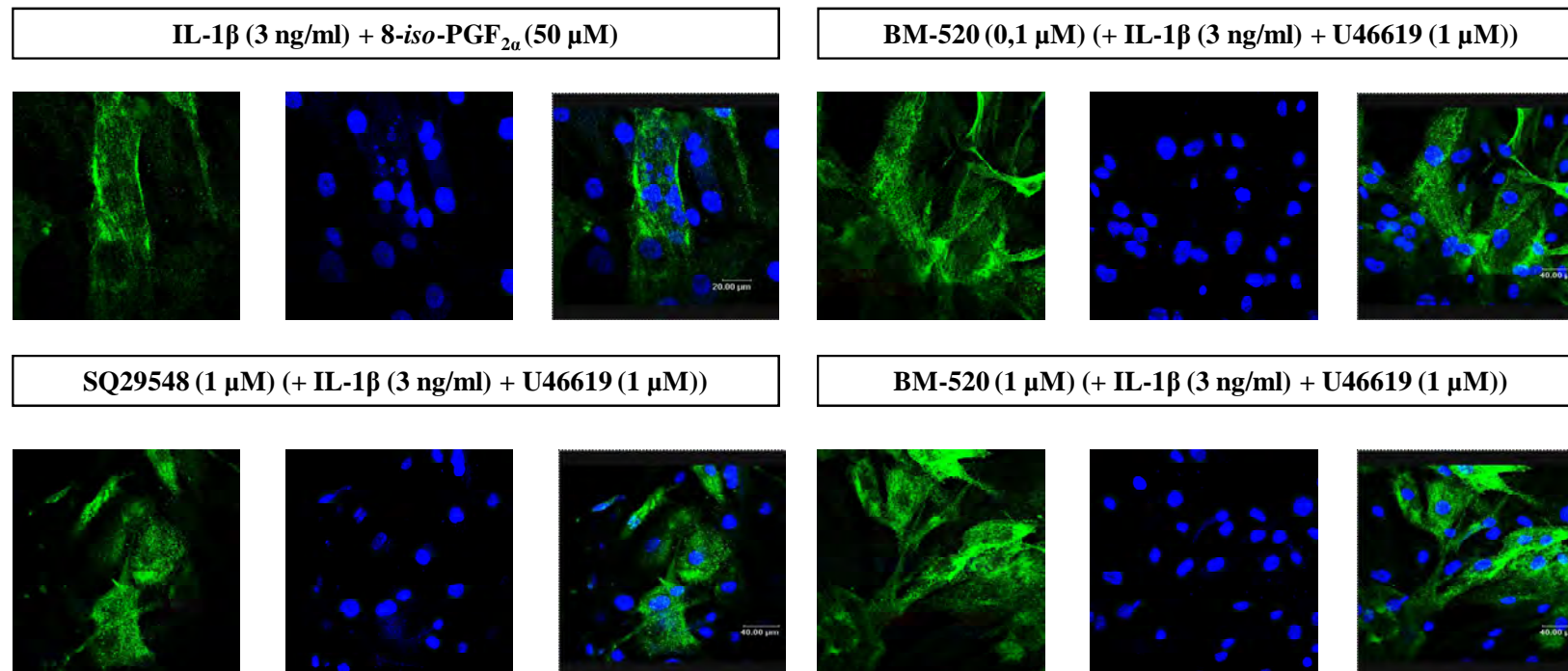
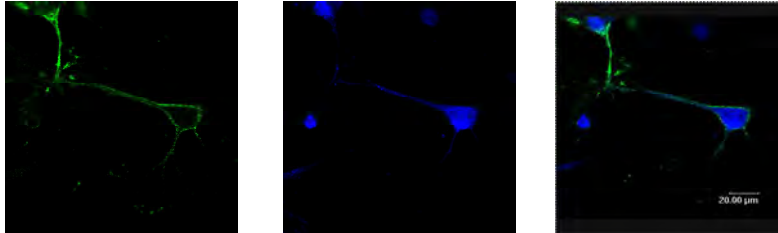


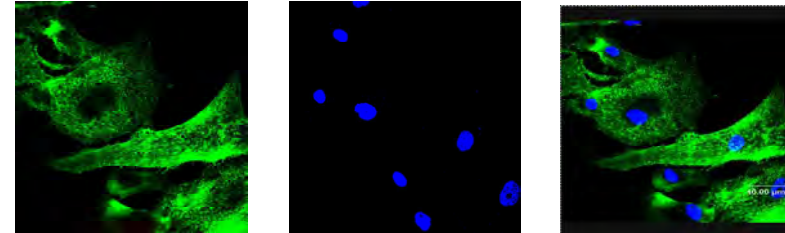
Figure III.16. : Expression de VCAM-1 dans les cellules HVSMCs

Les cellules ont été fixées et VCAM-1 est marquée en vert grâce à un anticorps primaire qui lui est spécifique et à un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Le noyau des cellules apparaît en bleu suite au marquage par le To-Pro 3. Les images de gauche représentent la fluorescence émise dans le vert, celles du milieu la fluorescence émise dans le bleu et celles de droite la superposition des deux images.

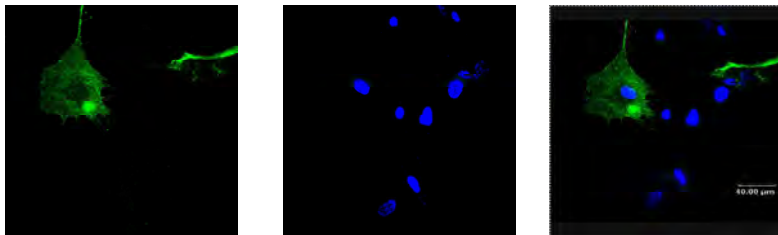
Contrôle



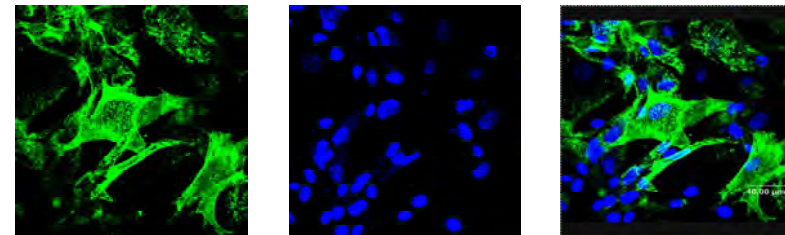
IL-1 β (3 ng/ml)



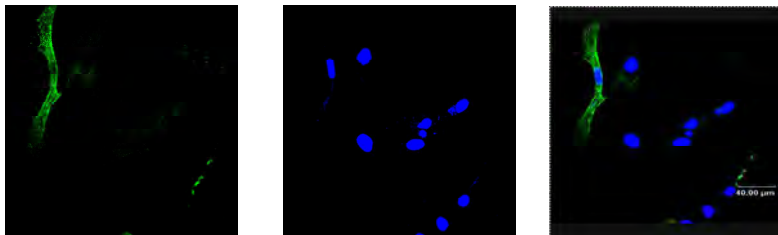
U466619 (1 μ M)



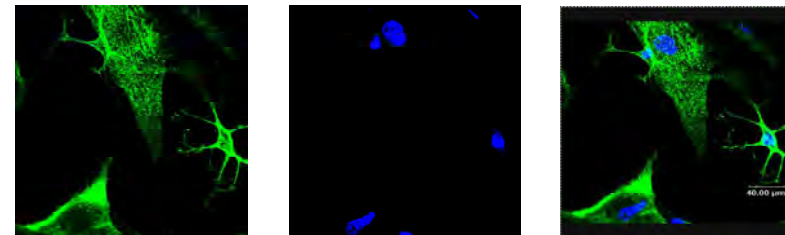
IL-1 β (3 ng/ml) + U466619 (1 μ M)



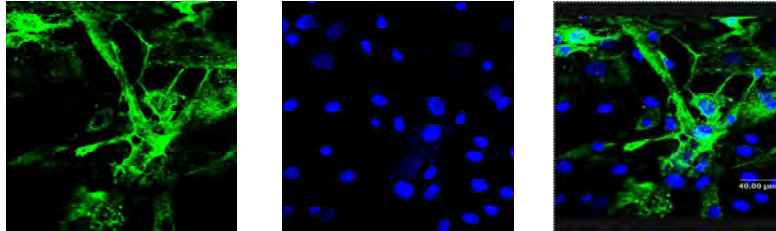
8-*iso*-PGF_{2 α} (50 μ M)



IL-1 β (3 ng/ml) + 8-*iso*-PGF_{2 α} (50 μ M)



SQ29548 (1 μ M) (+ IL-1 β (3 ng/ml) + U46619 (1 μ M))



BM-520 (1 μ M) (+ IL-1 β (3ng/ml) + U46619 (1 μ M))

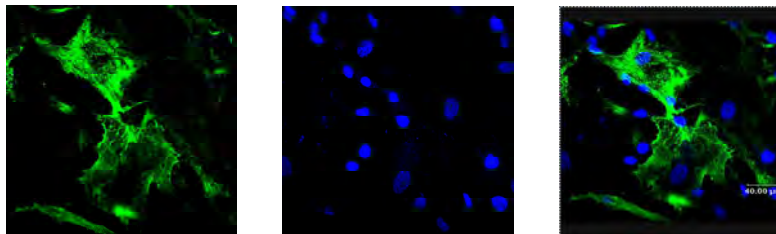
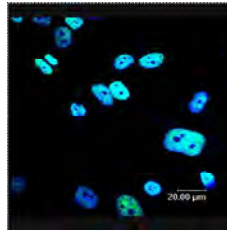
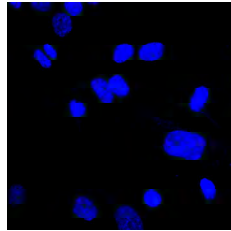
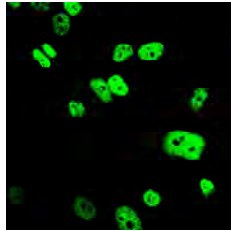


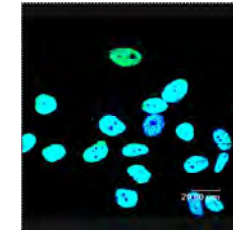
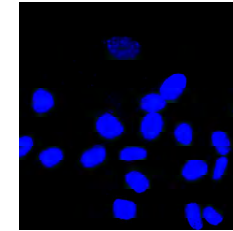
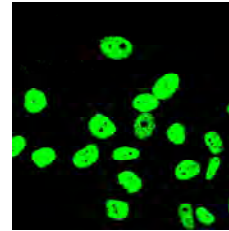
Figure III.18. : Expression de ICAM-1 dans les cellules HVSMCs

Les cellules ont été fixées et ICAM-1 est marquée en vert grâce à un anticorps primaire qui lui est spécifique et à un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Le noyau des cellules apparaît en bleu suite au marquage par le To-Pro 3. Les images de gauche représentent la fluorescence émise dans le vert, celles du milieu la fluorescence émise dans le bleu et celles de droite la superposition des deux images.

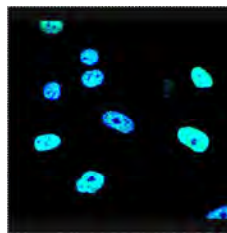
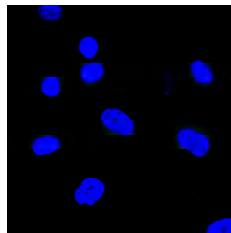
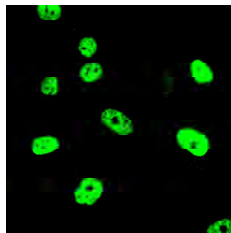
Contrôle



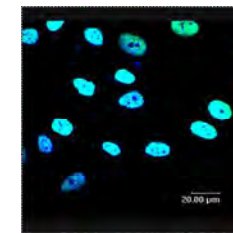
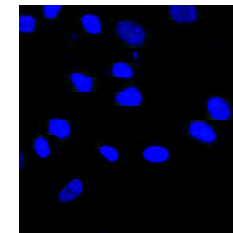
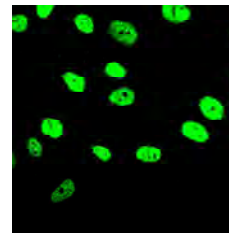
IL-1 β (3ng/ml)



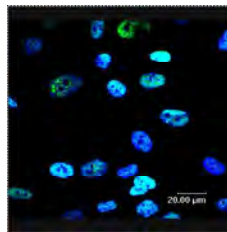
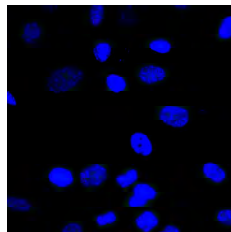
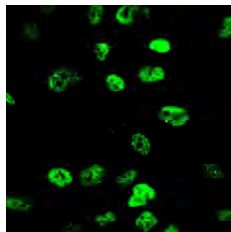
U466619 (1 μ M)



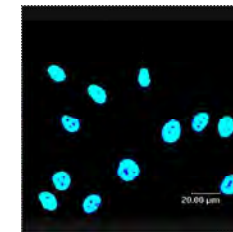
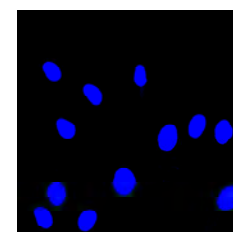
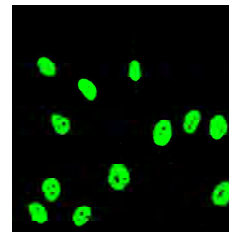
IL-1 β (3 ng/ml) + U466619 (1 μ M)



8-*iso*-PGF_{2 α} (50 μ M)



IL-1 β (3 ng/ml) + 8-*iso*-PGF_{2 α} (50 μ M)



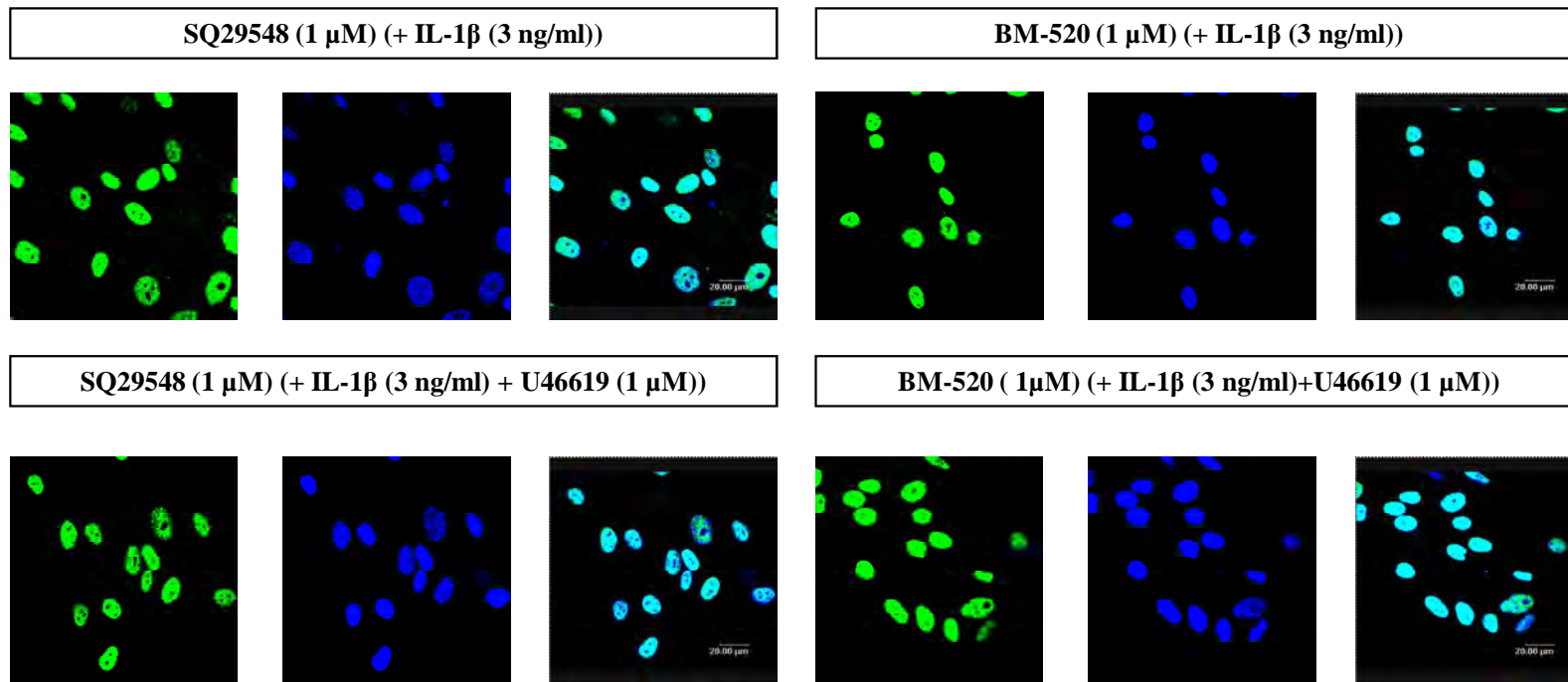
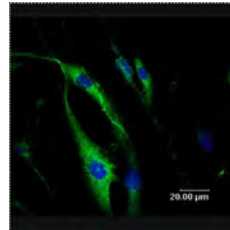
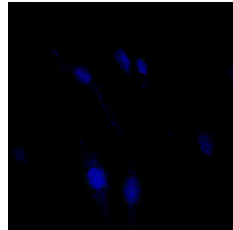
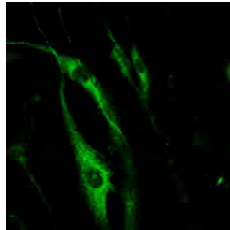


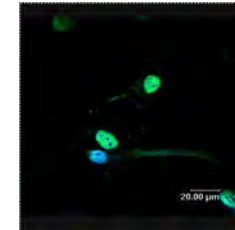
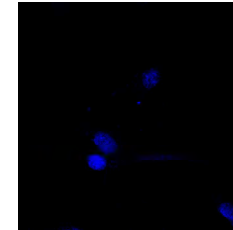
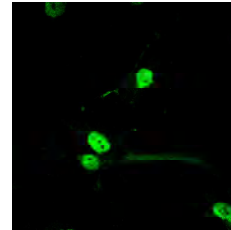
Figure III.13 : Expression de c-Jun dans les cellules HVSMCs

Les cellules ont été fixées et perméabilisées et c-Jun est marquée en vert grâce à un anticorps primaire qui lui est spécifique et à un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Le noyau des cellules apparaît en bleu suite au marquage par le To-Pro 3. Les images de gauche représentent la fluorescence émise dans le vert, celles du milieu la fluorescence émise dans le bleu et celles de droite la superposition des deux images.

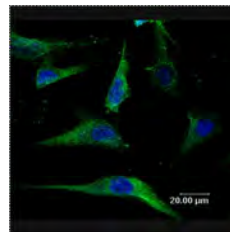
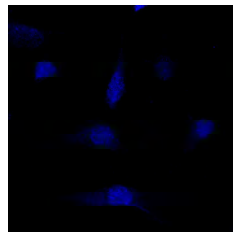
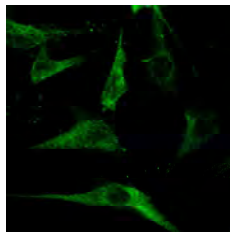
Contrôle



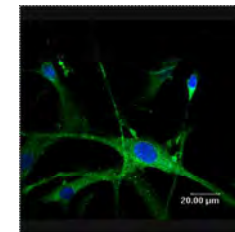
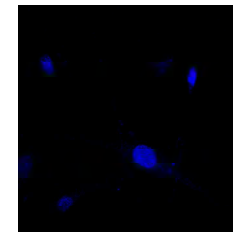
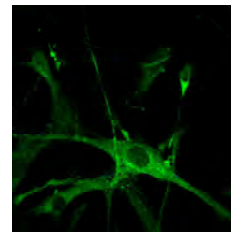
IL-1 β (3 ng/ml)



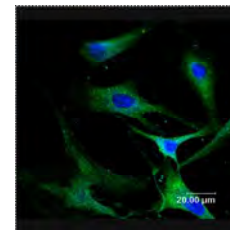
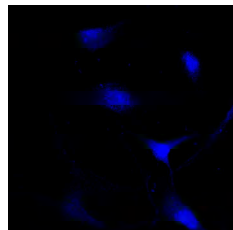
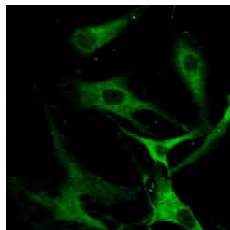
U466619 (1 μ M)



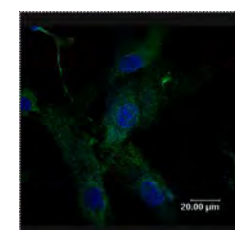
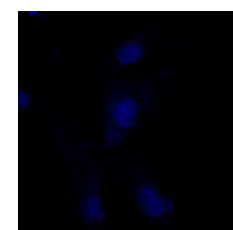
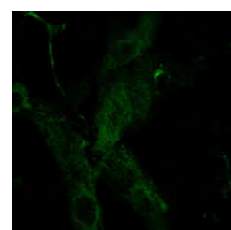
SQ29548 (1 μ M)



8-*iso*-PGF_{2 α} (50 μ M)



BM-520 (1 μ M)



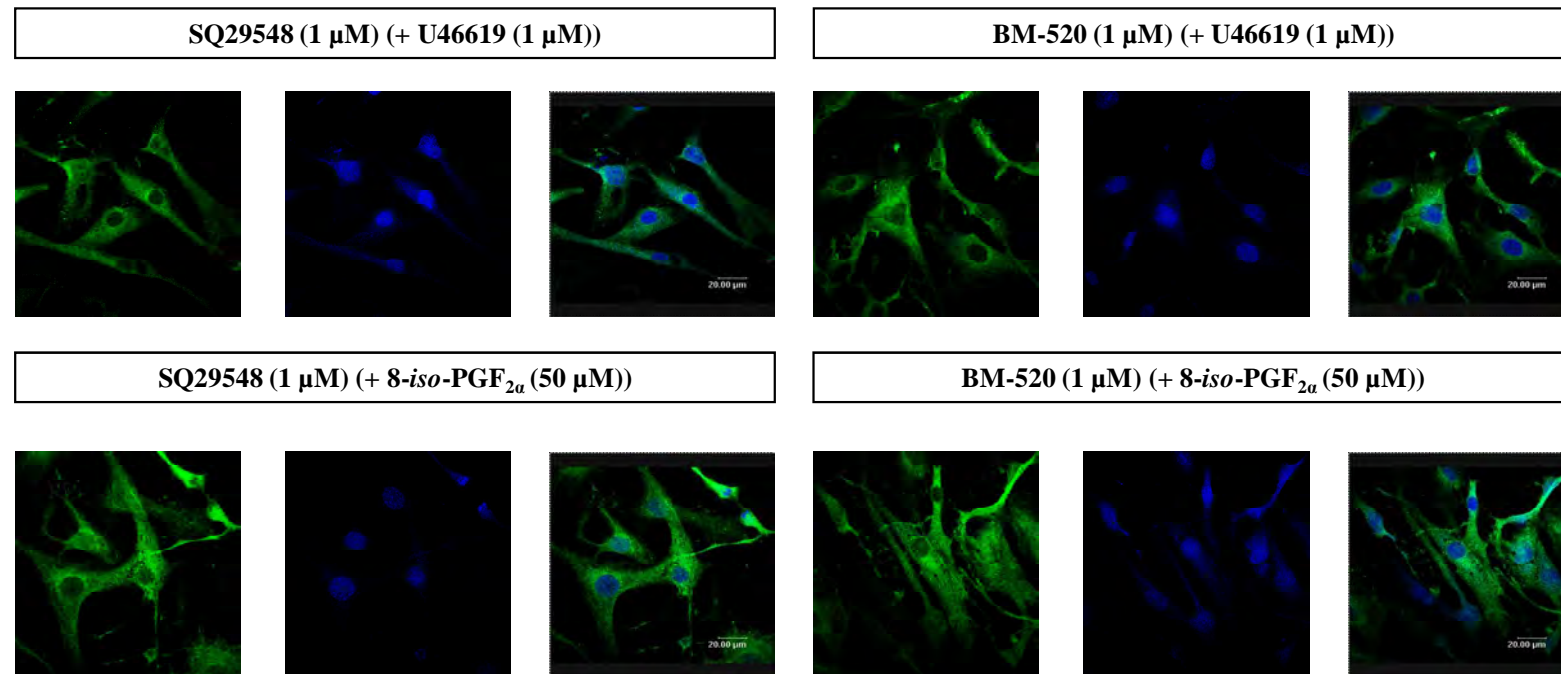


Figure III.20. : Expression de p65 dans les cellules HVSMCs

Les cellules ont été fixées et perméabilisées et p65 est marquée en vert grâce à un anticorps primaire qui lui est spécifique et à un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Le noyau des cellules apparaît en bleu suite au marquage par le To-Pro 3. Les images de gauche représentent la fluorescence émise dans le vert, celles du milieu la fluorescence émise dans le bleu et celles de droite la superposition des deux images.

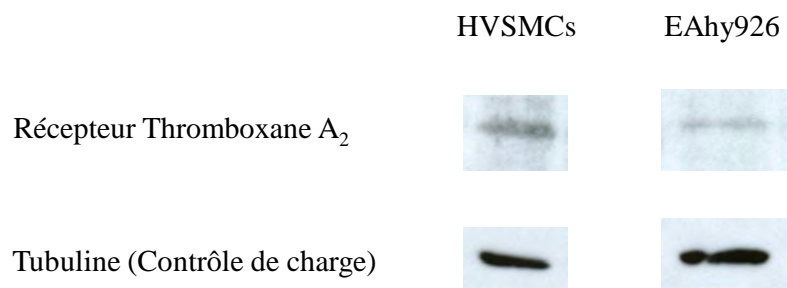


Figure III.2. : Expression du récepteur TP dans les cellules HVSMCs et EAhy926

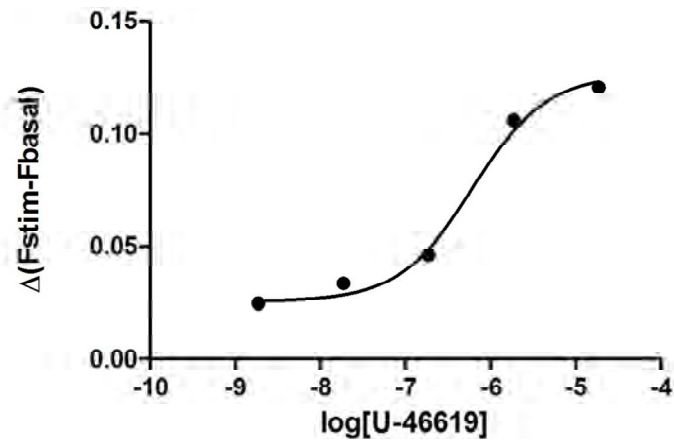
Des extraits cellulaires totaux ont été obtenus à partir de cellules HVSMCs et de cellules endothéliales EAhy926. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, le récepteur TP a été révélé par western blot à l'aide d'un anticorps spécifique. La révélation de la tubuline α sert de contrôle de charge.

	HVSMCs (delta Ct)	EAhy926 (delta Ct)
Récepteur TPα	8,14	10,7
Récepteur TPβ	8,67	11,2

Figure III.3. : Expression de l'ARNm du récepteur TP dans les cellules HVSMCs et EAhy926

Les ARNm ont été extraits de cellules HVSMCs et EAhy926 et rétrotranscrits. Les ARNm des récepteurs TP α et β ont ensuite été quantifiés par PCR en temps réel et les Ct (*Cycle threshold*) sont obtenus. Les delta Ct représentent les valeurs obtenues après normalisation avec un gène de ménage.

A.



B.

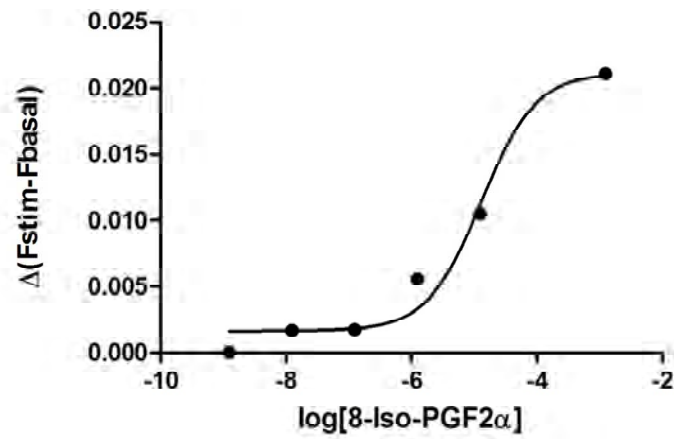


Figure III.4. : Effets des agonistes du récepteur TP sur la mobilisation cytosolique du Ca^{2+}

Les cellules HVSMC sont exposées à des concentrations croissantes A) de U46619 et B) de 8-*iso*-PGF_{2α}. La présence du Ca^{2+} cytosolique est visible grâce à une sonde fluorescente. Les valeurs de fluorescence émises sont obtenues pour chaque concentration et une courbe dose-réponse est réalisée.

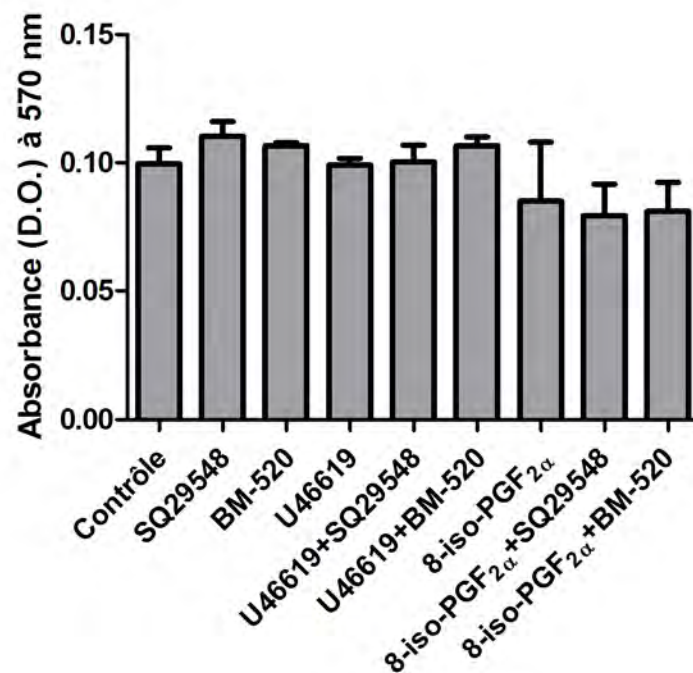
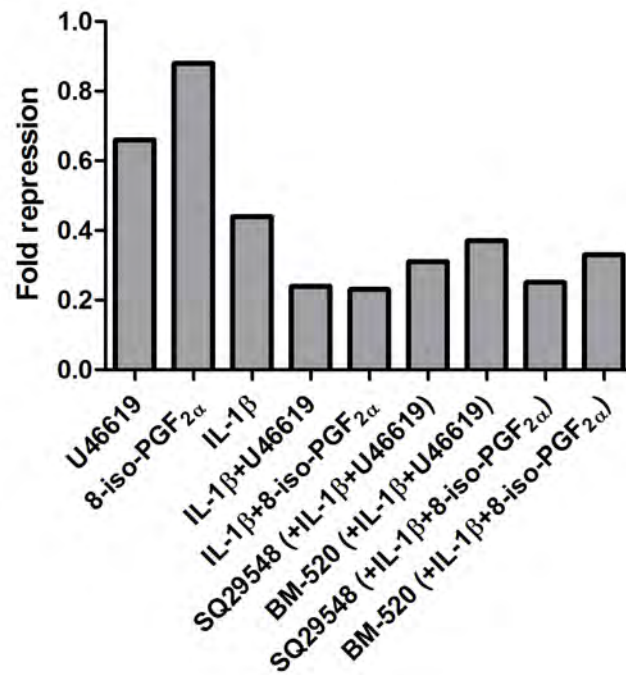


Figure III.5. : Effet des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la prolifération cellulaire

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant quatre jours dans du milieu de culture contenant 0,5 % de sérum et en présence ou non des différents agonistes et/ou antagonistes du récepteur TP. Après l'incubation, la quantité de cellules vivantes a été estimée au moyen d'un test MTT. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes (\pm 1 écart-type ; n=3).

A.



B.

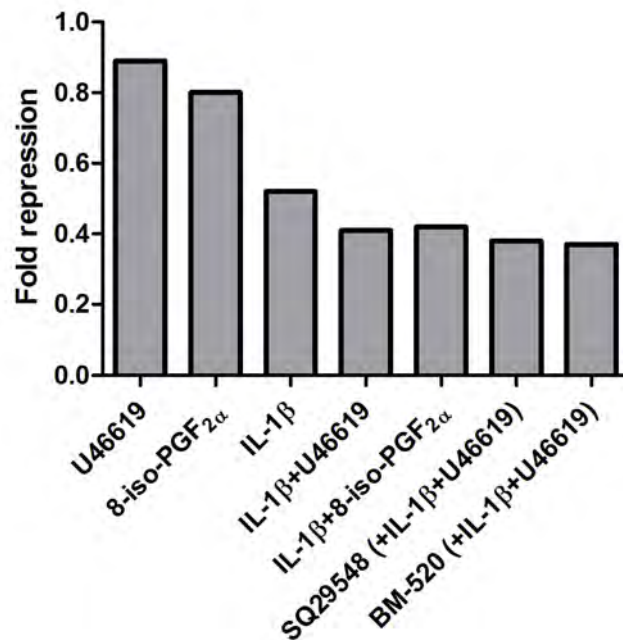
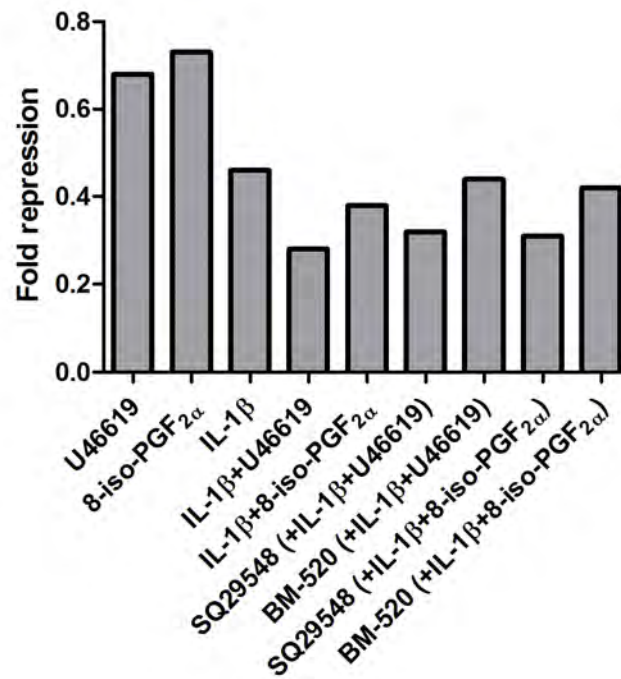


Figure III.6. : Effets de l'IL-1β et des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de l'ARNm du récepteur TPα

Les cellules ont été incubées en présence des différentes molécules pendant A) 6 heures et B) 16 heures. Après incubation, les ARNm ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm du récepteur TPα a ensuite été quantifié par PCR en temps réel et les *fold inductions* ont été calculés par rapport aux cellules contrôles correspondantes.

A.



B.

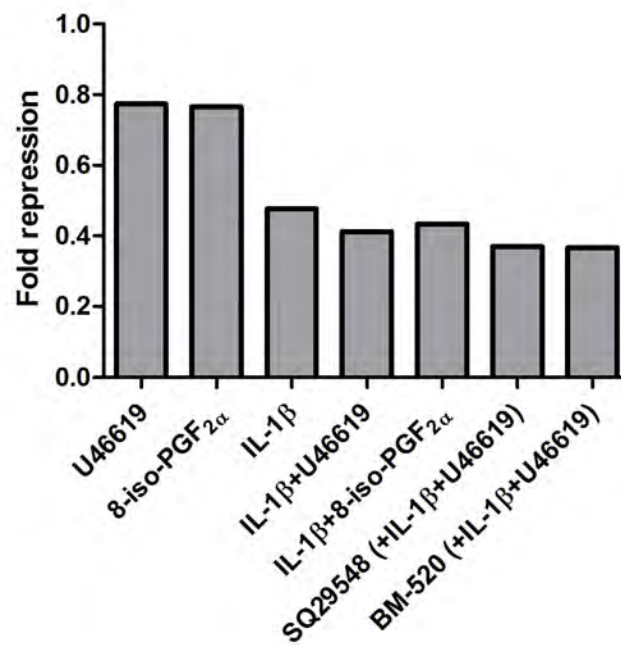


Figure III.7. : Effets de l'IL-1β et des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de l'ARNm du récepteur TPβ

Les cellules ont été incubées en présence des différentes molécules pendant A) 6 heures et B) 16 heures. Après incubation, les ARNm ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm du récepteur TPβ a ensuite été quantifié par PCR en temps réel et les *fold inductions* ont été calculés par rapport aux cellules contrôles correspondantes.

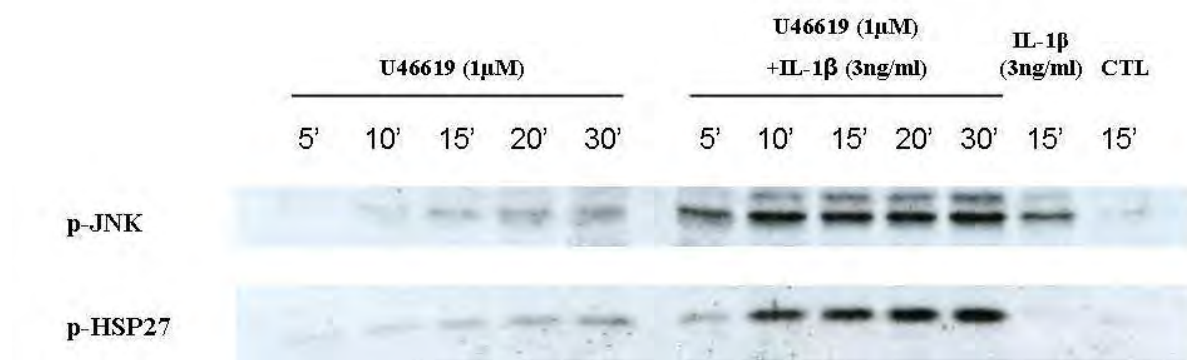


Figure III.8. : Effets du U46619 et de l'IL-1β sur l'activation des kinases JNK et p38

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 5, 10, 15, 20 et 30 minutes dans le milieu de culture et en présence de U46619 seul ou de U46619 et d'IL-1β. Des extraits cellulaires totaux ont ensuite été obtenus. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, p-JNK et p-HSP27 ont été révélés par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques.

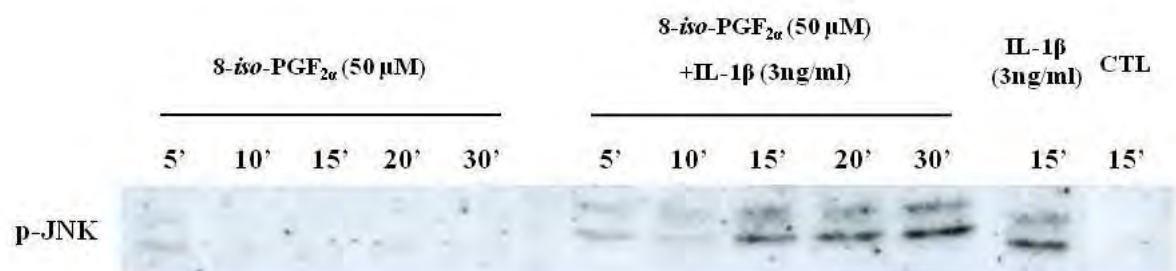


Figure III.9. : Effets du 8-iso-PGF_{2α} et de l'IL-1β sur l'activation de la kinase JNK

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 5, 10, 15, 20 et 30 minutes dans le milieu de culture et en présence de 8-iso-PGF_{2α} seul ou de 8-iso-PGF_{2α} et d'IL-1β. Des extraits cellulaires totaux ont ensuite été obtenus. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, p-JNK a été révélé par western blot à l'aide d'un anticorps spécifique.

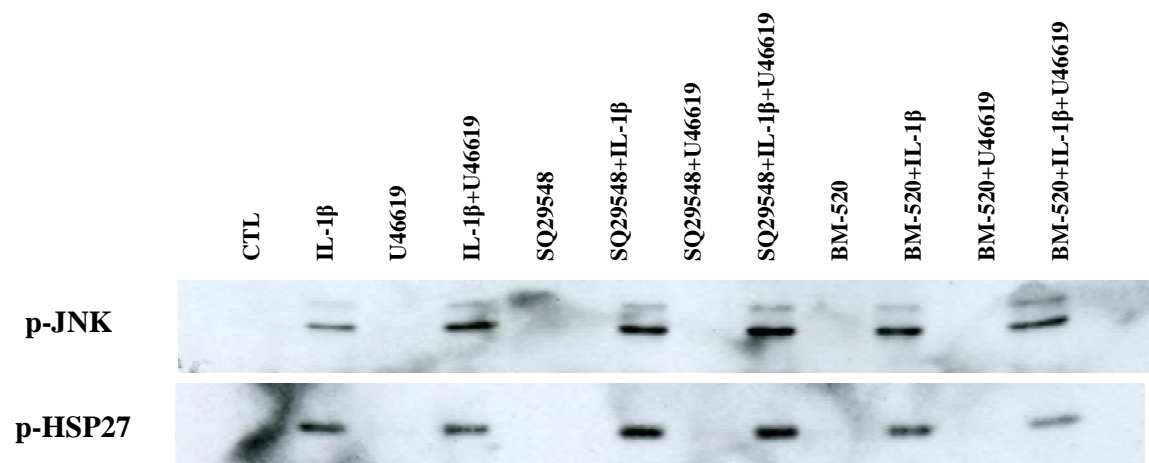


Figure III.10. : Effets du SQ29548 et du BM-520 sur l'activation des kinases JNK et p38

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 20 minutes dans le milieu de culture et en présence ou non des différents agonistes et/ou antagonistes du récepteur TP. Des extraits cellulaires totaux ont ensuite été obtenus. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, p-JNK et p-HSP27 ont été révélés par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques.

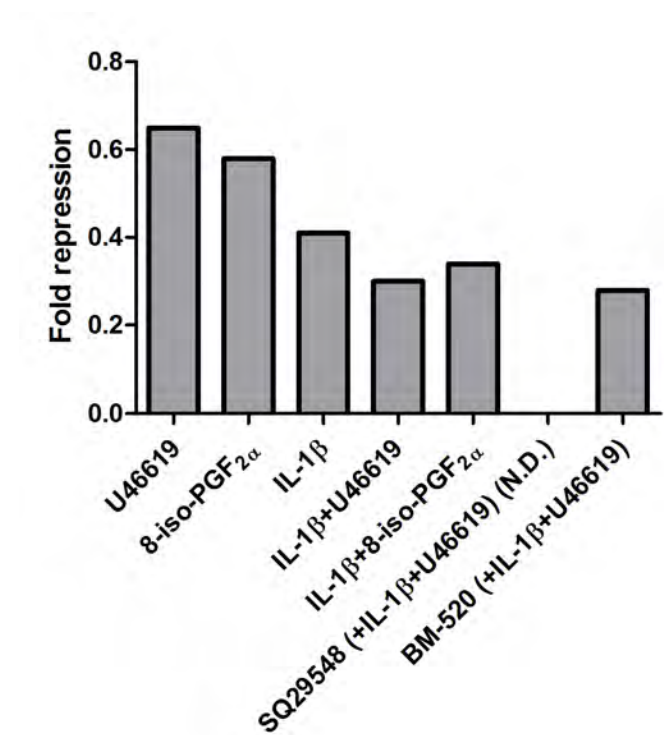


Figure III.11. : Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de l'ARNm de c-Jun

Les cellules ont été incubées en présence des différentes molécules pendant 16 heures. Après incubation, les ARNm ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm de c-Jun a ensuite été quantifié par PCR en temps réel et les fold inductions ont été calculés par rapport aux cellules contrôles correspondantes. (N.D. : non déterminé)

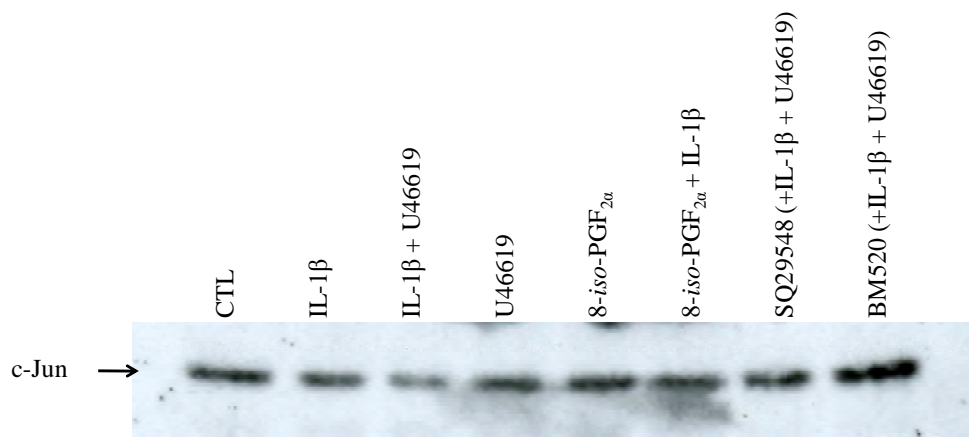


Figure III.12. : Expression de c-Jun dans les HVSMCs

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 16 heures dans le milieu de culture et en présence ou non des différents agonistes et/ou antagonistes du récepteur TP. Des extraits cellulaires nucléaires ont ensuite été obtenus. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, la protéine c-Jun a été révélée par western blot à l'aide d'un anticorps spécifique.

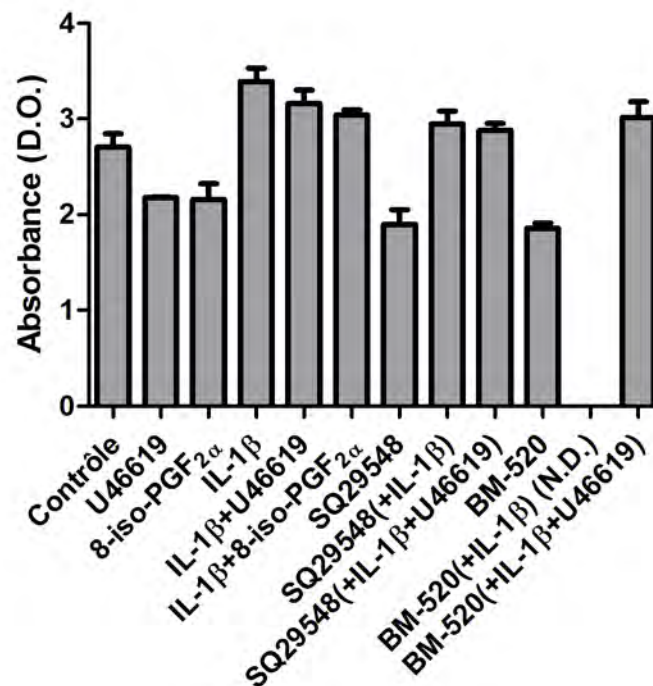
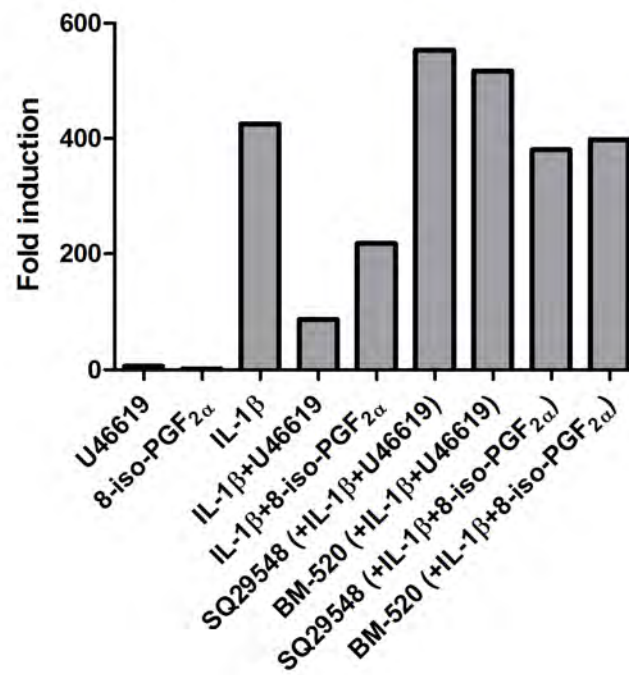


Figure III.14 : Effet des agonistes et antagonistes du récepteur TP sur de l'activité de liaison du facteur de transcription AP-1 à sa séquence consensus

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 20 minutes dans le milieu de culture et en présence ou non des différents agonistes et/ou antagonistes du récepteur TP. Des extraits protéiques nucléaires de HVSMCs et un anticorps anti-c-Jun spécifique ont été utilisés pour observer l'activité de liaison de AP-1 à sa séquence consensus. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes (+/- 1 écart-type ; n=3). (N.D. : non déterminé)

A.



B.

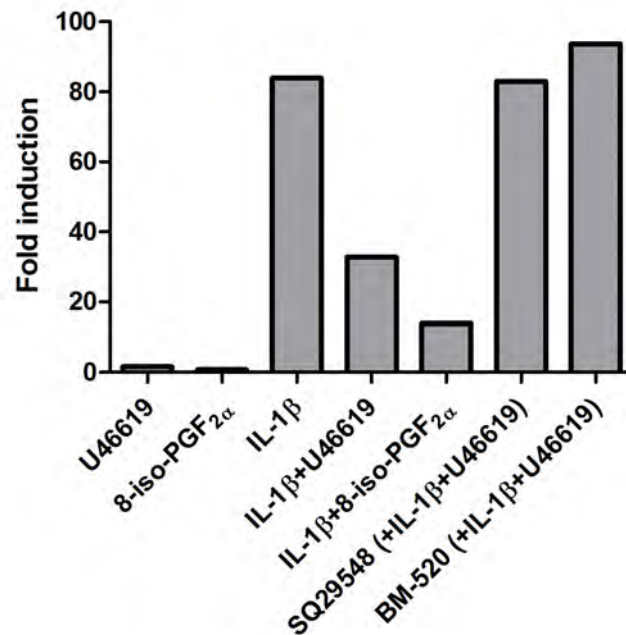
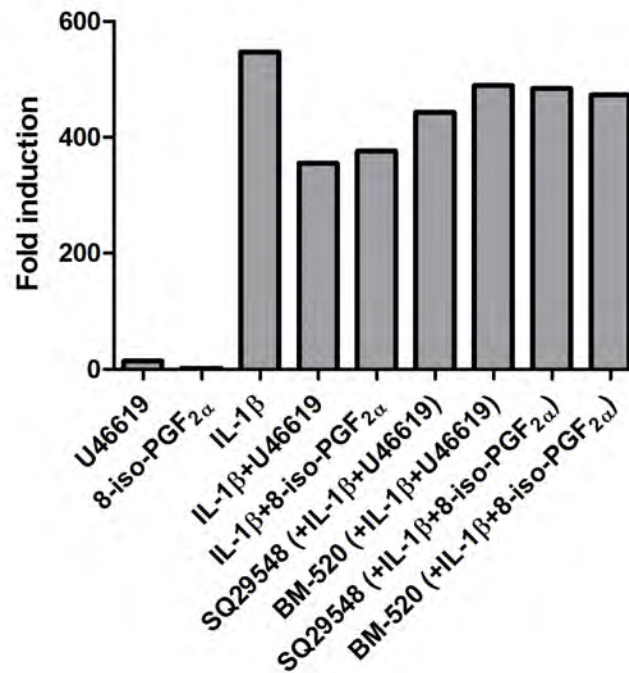


Figure III.15. : Effets de l'IL-1β et des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de l'ARNm de VCAM-1

Les cellules ont été incubées en présence des différentes molécules pendant A) 6 heures et B) 16 heures. Après incubation, les ARNm ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm de VCAM-1 a ensuite été quantifié par PCR en temps réel et les *fold inductions* ont été calculés par rapport aux cellules contrôles correspondantes.

A.



B.

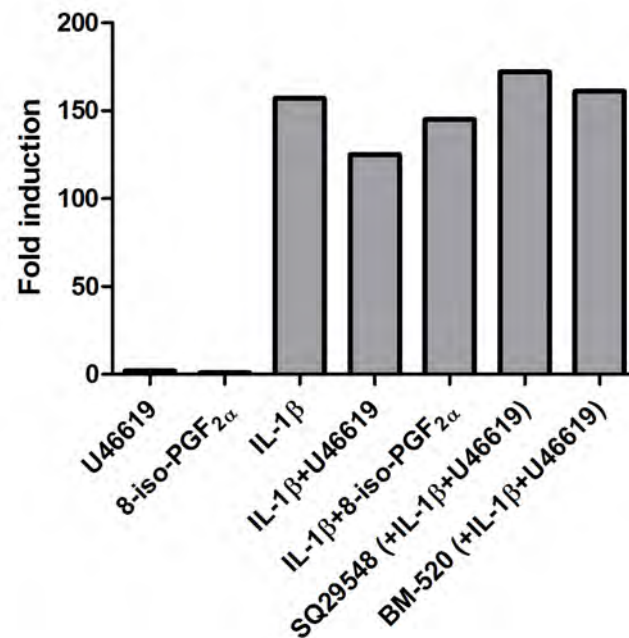


Figure III.17. : Effets de l'IL-1β et des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de l'ARNm de ICAM-1

Les cellules ont été incubées en présence des différentes molécules pendant A) 6 heures et B) 16 heures. Après incubation, les ARNm ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm de ICAM-1 a ensuite été quantifié par PCR en temps réel et les *fold inductions* ont été calculés par rapport aux cellules contrôles correspondantes.

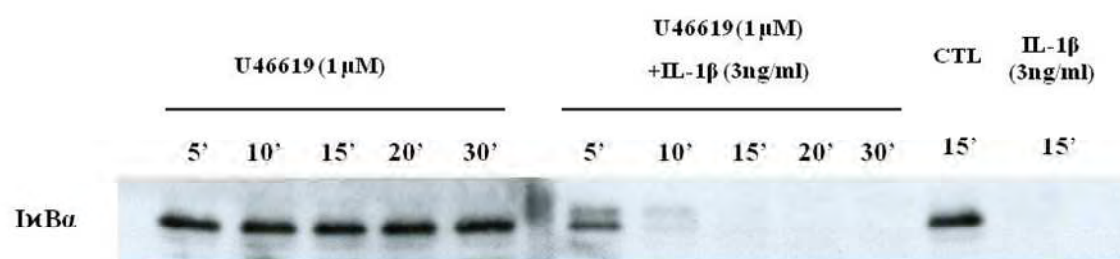


Figure III.19. : Expression de I- κ B α dans les cellules HVSMCs

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 5, 10, 15, 20 et 30 minutes dans le milieu de culture et en présence de U46619 seul ou de U46619 et d'IL-1 β . Des extraits cellulaires totaux ont ensuite été obtenus. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, I- κ B α été révélée par western blot à l'aide d'un anticorps spécifique.

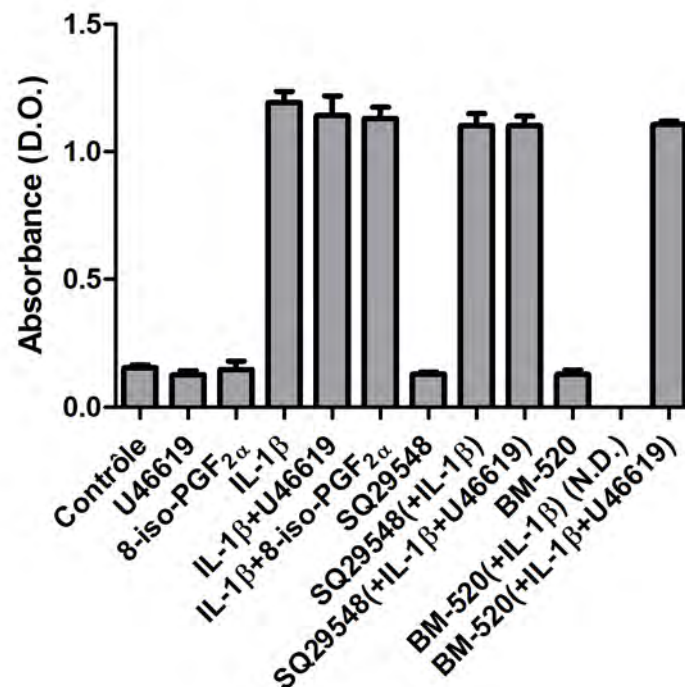
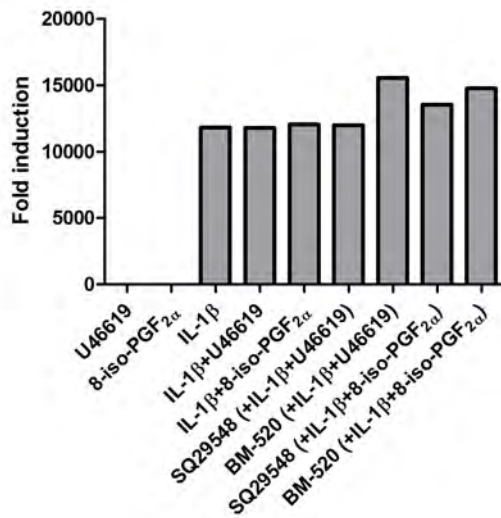


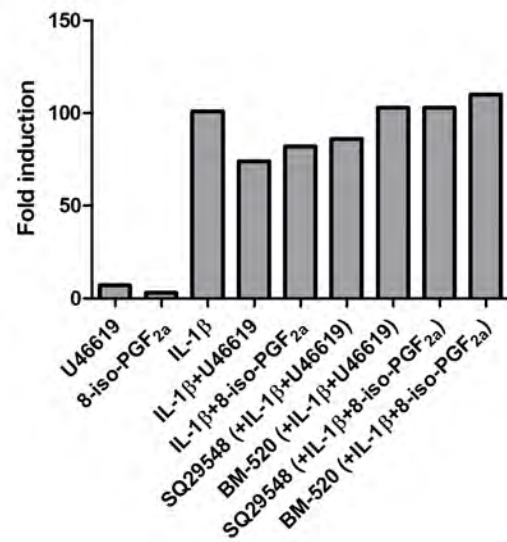
Figure III.21. : Effet des agonistes et antagonistes du récepteur TP sur de l'activité de liaison du facteur de transcription NF-kB à sa séquence consensus

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 20 minutes dans le milieu de culture et en présence ou non des différents agonistes et/ou antagonistes du récepteur TP. Des extraits protéiques nucléaires de HVSMCs et un anticorps anti-c-p65 spécifique ont été utilisés pour observer l'activité de liaison de NF-kB à sa séquence consensus. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes (\pm 1 écart-type ; n=3).

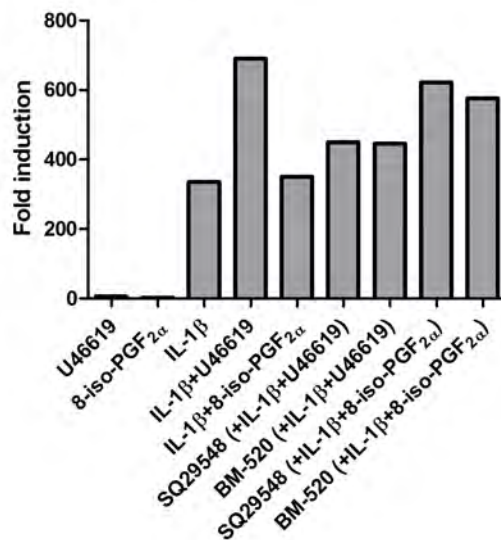
A.



B.



C.



D.

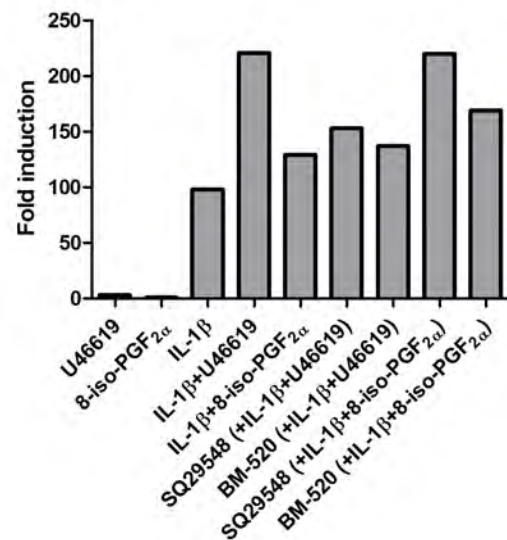
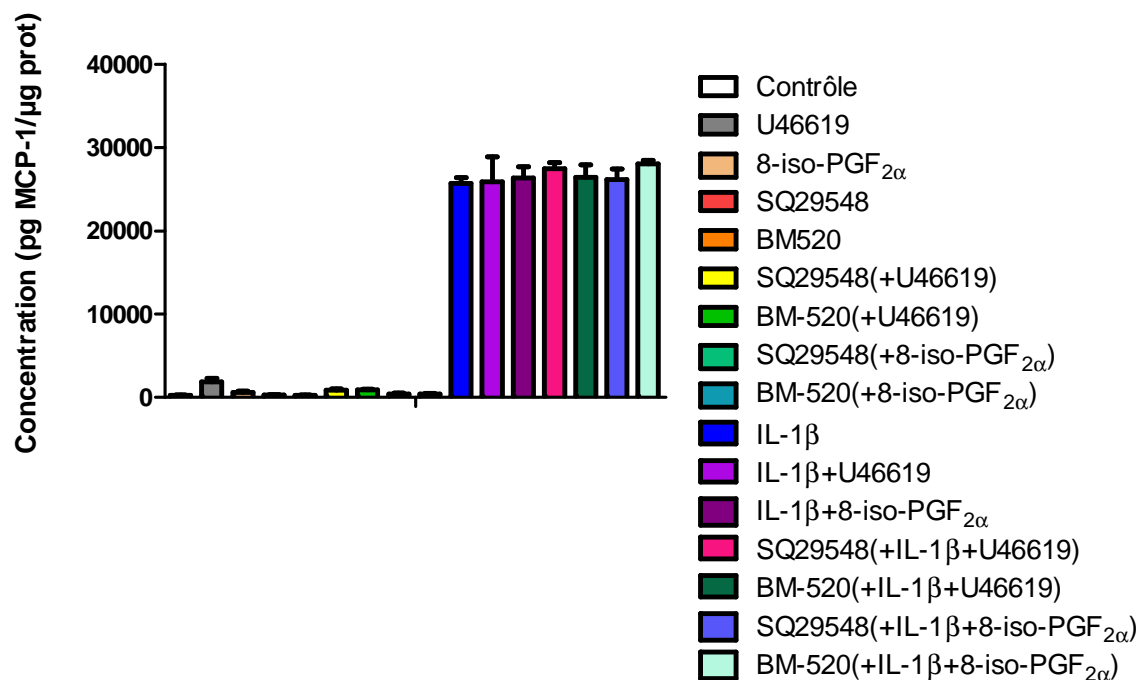


Figure 22 : Effets de l'IL-1 β et des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de l'ARNm de gène cibles de NF- κ B

Les cellules HVSMCs ont été incubées en présence des différentes molécules pendant 6 heures. Après incubation, les ARNm ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm de **A.** IL-8, **B.** MCP-1, **C.** IL-6 et **D.** COX-2 ont ensuite été quantifiés par PCR en temps réel et les *fold inductions* ont été calculés par rapport aux cellules contrôles correspondantes.

A.



B.

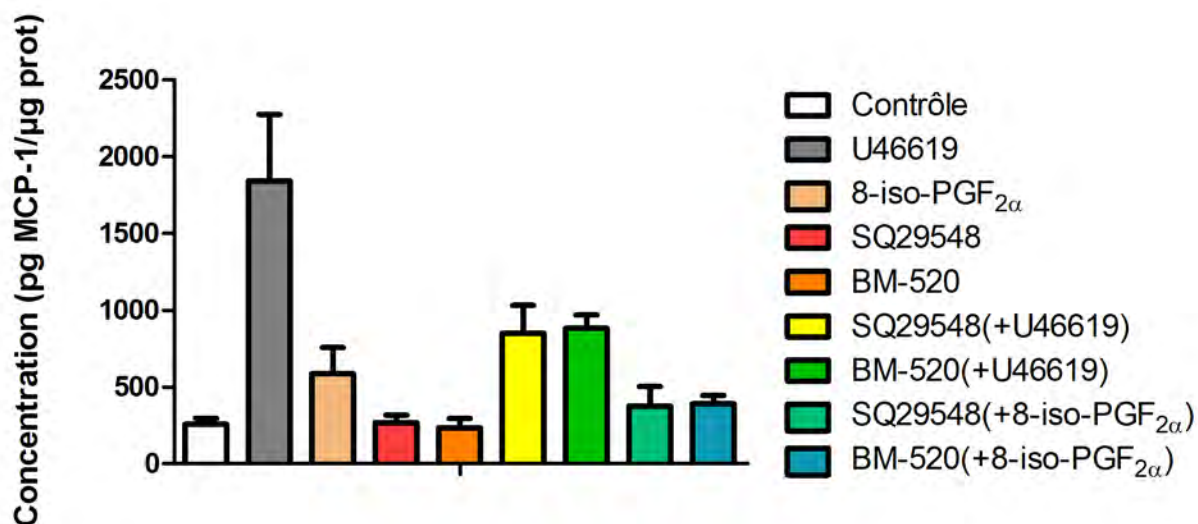


Figure III.23. : Effets des agonistes et antagonistes du récepteur TP sur la sécrétion de MCP-1

Les cellules HVSMCs ont été incubées pendant 6 heures en présence ou non des différents agonistes du récepteur TP. **A. et B.** Après l'incubation, la sécrétion de la cytokine MCP-1 a été mesurée (pg/μg de protéine). Les résultats sont présentés en tant que moyennes (+/- 1 écart-type ; n=3).

IV. Discussion, conclusions et perspectives

L'attraction des leucocytes dans une région spécifique du vaisseau et leur infiltration à travers la paroi est une étape importante dans la génération d'une réponse inflammatoire. L'athérosclérose est une des maladies chroniques dans lesquelles un recrutement excessif de monocytes est un processus central de la pathologie. Pendant l'inflammation, de nombreuses interactions entre cellules sont importantes, notamment les interactions entre les leucocytes et l'endothélium mais aussi entre les monocytes et les cellules musculaires lisses (Huo & Ley, 2001). Le recrutement des monocytes dans la paroi artérielle requiert l'expression de diverses classes de molécules d'adhérence telles que la *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) ou l'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) à la fois à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.

Pour rappel, l'objectif de ce travail était d'évaluer les effets de deux agonistes (le U46619 et 8-*iso*-PGF_{2α}) et les effets de deux antagonistes (SQ29548 et BM-520) du récepteur au thromboxane A₂ sur la régulation de l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1 dans les HVSMCs.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser les cellules musculaires lisses humaines. Le phénotype contractile de ces cellules a été mis en évidence par immunomarquage de l'isoforme α de l'actine. Cette isoforme est la protéine majoritaire chez les CML matures, et peut représenter jusqu'à 75% des différentes isoformes d'actine présentes chez les CML et 40% des protéines totales (Toussaint *et al.*, 2003). L'abondance de la protéine dans l'espace cellulaire ainsi que le réseau dense et organisé qu'elle forme au sein des HVSMCs nous a permis de conclure au caractère mature de ces cellules. L'isoforme α de l'actine est également présente dans le contrôle négatif (EAhy926), mais le phénotype contractile n'est cependant pas mis en évidence car aucune organisation en réseau n'est observée.

La présence du récepteur TP dans les cellules HVSMCs a été mise en évidence par western blot, indiquant que l'abondance du récepteur dans ces cellules est constitutivement plus élevée que dans les cellules EAhy926.

Il existe deux isoformes du récepteur TP (α et β), provenant toutes deux d'un épissage alternatif du gène du récepteur TP. Ces deux transcrits ont une caractéristique importante : ils ne sont pas issus uniquement d'exons, mais aussi d'introns. Cette particularité échappe cependant à de nombreux chercheurs, dont un des critères lors de la conception des amorces est que l'amplicon généré par celles-ci doit chevaucher une limite exon/exon.

Nous avons donc analysé attentivement la séquence des deux ARNm, et conçu des amorces spécifiques de l'ARNm des récepteurs TP α et TP β tenant compte de cette particularité. La quantification de l'ARNm des deux isoformes du récepteur TP présents dans les cellules HVSMCs et EAhy926 montrent, comme pour le western blot, une abondance plus importante des deux ARNm dans les HVSMCs. Cette abondance dans les cellules musculaires lisses humaines apparaît tout à fait normale. En effet, l'activation du récepteur au thromboxane A₂ a, comme rôle principal d'induire la contraction de la cellule par une mobilisation du calcium intracellulaire.

Afin de vérifier si les récepteurs TP étaient bien fonctionnels dans les HVSMCs, l'accumulation cytosolique du calcium a été détectée à l'aide d'une sonde fluorescente après stimulation avec les agonistes (U46619 et 8-*iso*-PGF_{2α}) du récepteur. L'augmentation de

fluorescence (et donc de la concentration intracellulaire en Ca^{2+}) dans les deux conditions démontre que le récepteur est bel et bien fonctionnel. Un décalage entre les deux courbes dose-réponse est cependant observé, indiquant d'une part que le 8-*iso*-PGF_{2α} n'a pas une activité agoniste aussi puissante que le U46619 et que, d'autre part, il induit une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire quantitativement beaucoup moins importante que le U46619.

Le U46619 est une molécule synthétique, dont la structure a été optimisée pour se lier spécifiquement au récepteur TP. Le 8-*iso*-PGF_{2α} est par contre une molécule naturelle endogène, dont l'action sur le récepteur TP a été démontrée. Cependant, l'hypothèse d'un récepteur spécifique au 8-*iso*-PGF_{2α} n'a jamais été exclue. Fukunaga aurait même réussi à le mettre en évidence dans des cellules musculaires lisses de rat (Fukunaga, 1993), mais le peu d'articles disponibles sur ce récepteur spécifique laisse planer le doute sur son existence. L'hypothèse de l'existence d'un tel récepteur n'est donc pas écartée chez l'humain, et sa fonction principale devrait être différente de celle du récepteur TP. Une autre hypothèse pourrait être une affinité différente des deux agonistes pour le récepteur TP. En effet, bien que le 8-*iso*-PGF_{2α} agisse sur le récepteur TP, ce dernier n'est peut-être pas le seul récepteur qui lui est spécifique. La différence d'affinité pour le récepteur TP et/ou la présence éventuelle d'un récepteur spécifique au 8-*iso*-PGF_{2α} pourrai(en)t expliquer les différences obtenues dans ce travail entre les actions des deux agonistes.

L'activation du récepteur TP est également connue pour induire la prolifération des VSMCs de rat (Nagata *et al.*, 1992). Ce phénomène n'a pas été observé dans ce travail chez les HVSMCs. L'effet du U46619 sur la prolifération avait déjà été testé sur des VSMCs de rat, et contrairement à ce qui était attendu, l'agoniste n'a pas augmenté la prolifération cellulaire. Par contre, le contenu protéique a augmenté, donnant un phénotype hypertrophique (Craven *et al.*, 1996). Des expériences complémentaires en optimisant les conditions (pourcentage de sérum et temps d'incubation) et en mesurant également le contenu protéique devront être prévues afin d'approfondir ce résultat.

Un ralentissement de la prolifération par rapport aux cellules contrôles est constaté pour les cellules incubées en présence de 8-*iso*-PGF_{2α}. L'hypothèse d'un récepteur spécifique au 8-*iso*-PGF_{2α} pourrait également expliquer ces résultats, mettant en évidence une régulation négative de la prolifération qui ne serait pas inhibée par les antagonistes spécifiques du récepteur TP.

Lors de l'étude des effets des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de l'ARNm des deux isoformes, nous avons constaté que les HVSMCs sous-exprimaient les deux récepteurs dans certaines conditions. En effet, nous avons remarqué que les cellules incubées en présence d'IL-1β montraient une diminution de l'ARNm des récepteurs TPα et TPβ. L'IL-1β est connue pour être un activateur important de la voie NFκB. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette diminution de l'expression des deux isoformes du récepteur TP passe via l'activation de la voie NF-κB.

Cette hypothèse est soutenue par les observations décrites dans la publication en septembre d'un article de Zhang (Zhang *et al.*, 2008). L'auteur et son équipe ont développé un modèle *in vitro* de culture organique d'artères mésentériques de rat. Ils ont montré, avec ce modèle, qu'il existait une sous-régulation du récepteur TP dans les VSMCs de rats lors de l'activation des voies de signalisation de ERK1/2 et de p38/NFκB. Cette sous-régulation est atténuée lors de l'inhibition de ERK1/2, p38 et NF-κB mais pas de JNK. Ils ont également montré que la production de PGI₂ et d'oxyde nitrique (NO), connus pour supprimer l'expression des récepteurs couplés aux protéines G, n'avait aucun effet sur la diminution de la réponse contractile médiée par le récepteur TP et que cette contraction était donc

indépendante de l'intégrité de l'endothélium. Il est donc possible que l'activation du facteur de transcription NF- κ B déclenche la transcription de certaines cytokines et de facteurs de croissance, qui réguleraient négativement l'expression du récepteur TP en agissant sur sa transcription. Cette dernière hypothèse a déjà été démontrée lors de cultures organiques de cellules musculaires lisses de trachée de souris. L'IL-1 β induit dans ces cellules une sous-régulation des récepteurs ET $_B$ par une augmentation de la transcription du gène codant pour son ligand, l'endothéline-1, qui va à son tour entraîner une sous-expression des récepteurs (Zhang *et al.*, 2004).

Un grand nombre d'études ont déjà montré les effets du U46619, du 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$, du SQ29548 et (dans une moindre mesure) du BM-520 sur les cellules endothéliales. Très peu d'études cependant se sont intéressées aux effets que ces molécules pourraient avoir sur les cellules musculaires lisses. Paradoxalement, le peu d'études réalisées l'ont été majoritairement sur des cellules animales, et non humaines.

Il existe pourtant quelques différences entre les récepteurs TP d'animaux et ceux exprimés chez l'homme qu'il est important de prendre en compte. La différence principale est qu'il n'existe aucune isoforme du récepteur TP chez le rat ou la souris. Les récepteurs TP de ces deux dernières espèces sont similaires à l'isoforme α chez l'humain. Le rôle physiologique du récepteur TP β chez l'humain n'est pas encore clarifié, mais il pourrait peut-être influencer positivement ou négativement les voies de signalisation du récepteur TP α , ou encore déclencher sa propre voie de signalisation. Les régions du récepteur TP en relation avec les protéines G sont également importantes dans la compréhension de la signalisation. La troisième boucle intracellulaire et l'extrémité C-terminale font partie de ces régions. Lorsque l'on compare les séquences en acides aminés des récepteurs TP α et TP β humains et TP de rat, on constate que la sérine 191 est remplacée par une arginine chez le rat, et la sérine 239 est quant à elle remplacée par une cystéine. L'extrémité C-terminale est variable entre les récepteurs TP d'homme, de souris et de rat (Nakahata, 2008). Cette différence entre espèces montre qu'une différence dans la transduction du signal à partir du récepteur TP pourrait exister en fonction de l'espèce.

Pour réaliser notre étude des effets des modulateurs du récepteur TP sur l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1, nous nous sommes basés sur l'article de Bayat (Bayat *et al.*, 2008). Cet article montre que l'activation du récepteur TP via la voie de signalisation JNK induit une augmentation de l'expression de VCAM-1 induite par l'IL-1 β et ceci, dans des VSMCs de rat.

Nous avons étudié les effets du U46619 et du 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$ seuls et en association avec l'IL-1 β sur l'expression de VCAM-1 et ICAM-1. Cette étude a été réalisée à la fois aux niveaux transcriptionnel et protéique. La découverte de Bayat (Bayat *et al.*, 2008) montrant que l'activation du récepteur TP par le U46619 déclenche les voies de signalisation JNK et p38 MAPKs, et que cette activation influence l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1, nous a poussé à étudier ces voies de plus près afin d'approfondir leurs effets sur l'expression des molécules d'adhérence.

Dans la voie de signalisation de JNK, le U46619 et l'IL-1 β seuls peuvent induire l'activation de JNK. L'association des deux molécules augmente fortement la phosphorylation de JNK avec un effet additif. Les antagonistes seuls ne déclenchent pas la phosphorylation de JNK mais ils sont capables d'inhiber l'effet du U46619, démontrant que l'activation du récepteur agit bien sur la voie JNK. Nous pouvons donc conclure à un effet additif ou synergique du U46619 et de l'IL-1 β sur la phosphorylation de JNK.

Dans la voie de signalisation de p38, l'IL-1 β n'a aucun effet et le U46619 seul ne peut induire qu'une faible activation. Cependant, lorsqu'ils sont combinés, un effet synergique apparaît et p-HSP27 est plus abondante. Les antagonistes seuls ne déclenchent pas la phosphorylation de HSP27, mais ils préviennent l'effet du U46619. Ces résultats montrent que l'activation du récepteur TP déclenche aussi la voie de signalisation des p38 MAPKs.

Contrairement au U46619, le 8-*iso*-PGF_{2 α} seul est incapable d'induire l'activation de JNK, et son association avec l'IL-1 β n'entraîne aucun effet synergique. Au vu de ce résultat, les effets du 8-*iso*-PGF_{2 α} associé ou non aux antagonistes sur la voie de signalisation de JNK n'ont pas été investigués.

Un des facteurs de transcription activé en aval de la voie de signalisation de JNK est AP-1. Nous avons donc cherché à savoir si AP-1 pouvait être activé lorsque les cellules étaient incubées en présence des différents modulateurs du récepteur TP. AP-1 est un homo- ou hétérodimère composé des membres des familles Jun et/ou Fos. Ni la quantification de l'ARNm, ni la quantification de l'abondance de la sous-unité c-Jun par western blot ou l'immunofluorescence, ne montre de variation de l'expression de c-Jun en présence d'IL-1 β et/ou des agonistes du récepteur TP. Une hypothèse possible de ces résultats négatifs serait un temps d'incubation trop long (16 heures).

C'est pourquoi, nous avons aussi analysé l'activité de liaison de AP-1 à sa séquence consensus pendant un temps de stimulation plus court de 20 minutes. Ni les agonistes, ni les antagonistes du récepteur TP n'influencent son activité. L'IL-1 β semble augmenter l'activité de liaison à l'ADN de AP-1 mais les agonistes et les antagonistes des récepteurs TP n'influencent pas cette augmentation.

La quantification de l'ARNm de VCAM-1 montre une très légère augmentation pour le U46619, alors que le 8-*iso*-PGF_{2 α} n'a aucun effet. L'association du U46619 ou du 8-*iso*-PGF_{2 α} avec l'IL-1 β n'entraîne pas une potentialisation de l'abondance de l'ARNm induit par l'IL-1 β mais, au contraire, une diminution. Cette diminution est relevée par l'ajout d'antagonistes, indiquant que cet effet des deux agonistes passe bien par le récepteur TP. Le même profil est observé lors de l'analyse de l'abondance d'ICAM-1, mais l'effet du U46619 et du 8-*iso*-PGF_{2 α} est moins important. Comme l'effet des agonistes sur l'activation de la voie JNK et sur l'expression de VCAM-1 est différent, on peut suggérer que cette voie n'intervient pas dans la régulation de l'expression de VCAM-1 dans les HVSMCs.

Une augmentation de l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 en surface des cellules est également visible pour les cellules qui ont été stimulées avec de l'IL-1 β . Les agonistes du récepteur TP n'influencent pas cette augmentation, contrairement à ce qu'avait observé Bayat (Bayat *et al.*, 2008).

Une explication possible serait que les cellules utilisées dans ce travail sont d'origine humaines, alors que cette équipe travaille avec des cellules de rat. Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les cellules de rat n'expriment qu'une seule isoforme du récepteur TP et les cellules humaines deux. Cette différence pourrait engendrer des modifications dans les voies de signalisation en aval et dans les réponses cellulaires qu'elles induisent.

Le U46619 est capable de stimuler la production de *basic fibroblast growth factor* (bFGF) dans des cellules musculaires lisses vasculaires de rat. Craven (Craven *et al.*, 1996) a démontré que ce bFGF augmentait la production du *transforming growth factor* (TGF- β) dans le milieu de culture de VSMCs ; ce qui est à mettre en relation avec une autre étude démontrant que le bFGF augmentait l'ARNm du TGF- β dans les VSMCs (Agrotis *et al.*,

1994). Le TGF- β est également capable d'auto-induire l'expression de son propre gène. L'augmentation de l'expression du TGF- β est liée à l'activité de la PKC. Le mécanisme par lequel le U46619 augmente la conversion du TGF- β latent en forme active et le rôle de la PKC ne sont pas connus.

Un an plus tôt, Gamble et son équipe (Gamble *et al.*, 1995) ont montré que des cellules musculaires lisses humaines dérivées de veines saphènes exprimaient très faiblement VCAM-1, mais qu'il était possible d'induire une augmentation de l'expression de cette protéine par des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β . Dans un modèle de co-culture de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales, ils ont également montré l'importance de l'interaction entre ces deux types cellulaires. En effet, dans ce type de culture, l'expression de VCAM-1 dans les VSMCs est au plus bas. Ils ont émis l'hypothèse que l'inhibition observée était due à la présence de TGF- β produit par les cellules endothéliales. Ils ont donc démontré que l'addition de TGF- β dans le milieu de cellules VSMCs stimulées au TNF- α entraînait une inhibition de l'expression de VCAM-1. Nous pouvons donc supposer que, dans notre modèle expérimental, le U46619 provoque la synthèse et la sécrétion de TGF- β qui inhibe alors l'induction de l'expression de VCAM-1.

Le TGF- β et l'IL-1 β sont tous deux capables d'induire l'expression de COX-2 et la libération de PGE₂ dans des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines. Au moyen d'un système rapporteur, ils ont montré que cette induction avait lieu à travers un mécanisme transcriptionnel (Bradbury *et al.*, 2002).

L'IL-4 est un autre inducteur de l'expression de VCAM-1 chez les cellules musculaires lisses vasculaires. L'induction de VCAM-1 en présence de cette cytokine n'est pas accompagnée d'une induction de COX-2. Cependant, lorsque les cellules sont incubées simultanément en présence d'IL-4 et d'IL-1 β , l'expression de VCAM-1 est diminuée (Bishop-Bailey *et al.*, 1998). Les résultats de cette étude sont similaires aux résultats que nous avons obtenus lors de l'étude des effets des modulateurs du récepteur TP sur l'expression de VCAM-1. Le U46619 ne permet pas d'augmenter l'expression de l'ARNm de COX-2, alors que l'IL-1 β le permet. L'association des deux molécules entraîne une importante augmentation de l'abondance de l'ARNm de COX-2. Pour la même condition, l'abondance de l'ARNm de VCAM-1 induite par l'IL-1 β diminue fortement. Le 8-*iso*-PGF_{2 α} possède une action similaire au U46619, mais l'augmentation de l'abondance de l'ARNm de COX-2 est moins importante, et parallèlement la diminution de VCAM-1 également. L'ajout de SQ29548 ou de BM-520 permet de réduire l'augmentation induite par le U46619 de l'induction de l'expression de COX-2 induite par l'IL-1 β . Cet effet apparaît cependant excessif, car l'effet des antagonistes devraient donner des niveaux d'induction proches de l'IL-1 β . En effet, l'effet des deux antagonistes sur les cellules stimulées simultanément au 8-*iso*-PGF_{2 α} et à l'IL-1 β permet de retrouver le niveau atteint par l'IL-1 β seule quand on quantifie l'expression de l'ARNm de VCAM-1.

L'IL-1 β permet d'induire la COX-2; cette enzyme pourrait alors être responsable d'une augmentation de la production de prostanoïdes dans la cellule. L'activation de l'adénylate cyclase est déclenchée par la voie de signalisation des récepteurs aux prostanoïdes. L'IL-1 β stimule la synthèse de l'AMPc par la voie COX-2 (Beasley, 1999). Braun *et al.* ont eux montré que l'AMPc était capable de réguler négativement l'expression de VCAM-1 induite par le TNF- α et l'IL-1 β dans des cellules musculaires lisses d'artères coronaires et de veines saphènes (Braun *et al.*, 1997). En effet, la stimulation de l'adénylate cyclase avec une molécule mimant la prostacycline (cicaprost) entraîne une diminution de l'induction de l'expression de l'ARNm de VCAM-1 et d'ICAM-1 induite par le TNF- α .

Dans l'introduction, nous avons vu que les voies de transduction du signal ne sont pas exactement les mêmes pour les deux isoformes du récepteur TP. En effet, leurs actions sur l'adénylate cyclase diffèrent : l'isoforme α l'active et l'isoforme β l'inhibe. Or, l'expression membranaire de l'isoforme TP β est moins importante que l'isoforme TP α (Sasaki, 2007). Ces données appuient donc l'hypothèse émise ci-dessus. Les souris et les rats n'ont qu'un seul récepteur TP, et la séquence de ce dernier est proche de celle du récepteur TP α humain. Cependant, cela ne signifie pas nécessairement que sa fonction est la même. Le rôle exact du récepteur TP β n'a toujours pas été déterminé chez l'homme. Cette différence dans l'expression des récepteurs TP entre l'homme et les rongeurs, et en particulier le rat, pourrait expliquer le fait que nous observons une diminution de l'expression des molécules d'adhérence induite par l'IL-1 β en présence des agonistes du récepteur TP, contrairement à Bayat *et al.* (2008) qui observait une augmentation chez des cellules musculaires lisses de rat.

L'hypothèse de la voie du TGF- β pourrait donc expliquer comment le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} influencent l'expression de VCAM-1 induite par l'IL-1 β . Cependant, nous n'excluons pas la possibilité d'une action directe des agonistes sur l'expression de COX-2. Afin de confirmer si l'une ou l'autre de ces voies sont bien impliquées dans l'inhibition induite par les agonistes de l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 induite par l'IL-1 β , il serait intéressant d'effectuer plusieurs expériences :

- ✓ Suivre la localisation cellulaire de VCAM-1 et d'ICAM-1 par immunomarquage après un temps d'incubation de 4 ou 6 heures.
- ✓ Doser le TGF- β dans le milieu d'incubation des cellules stimulées suivant les différentes conditions reprises dans ce travail.
- ✓ Mesurer l'activité de la PKC dans les différentes conditions et étudier l'effet d'anticorps neutralisant le TGF- β .
- ✓ Mesurer le taux d'AMPc dans les différentes conditions, en présence ou non d'un inhibiteur de COX-2
- ✓ Quantifier l'ARNm de VCAM-1 et ICAM-1 après incubation des cellules dans les différentes conditions, mais en ajoutant un inhibiteur de COX-2 ou un anticorps neutralisant le TGF- β dans les milieux.

L'IL-1 β active une voie de transcription du signal aboutissant au facteur de transcription NF- κ B. C'est ce facteur qui est responsable de l'augmentation de l'expression d'une série de protéines impliquées dans l'inflammation, dont VCAM-1 et ICAM-1. Nous avons observé que les agonistes du récepteur TP diminuent l'induction de l'expression de ces deux molécules d'adhérence induites par l'IL-1 β .

Une explication possible serait donc une régulation négative de la voie NF- κ B par le TGF- β et/ou les prostaglandines. Nous nous sommes donc intéressés aux effets potentiels des modulateurs du récepteur TP sur ce facteur de transcription. Nous avons montré que le U46619 seul n'avait aucun effet sur I- κ B α (ce qui a également été observé par Leitinger *et al.*, 2001), mais qu'en présence de U46619 et d'IL-1 β , la protéine était dégradée. Le U46619 ne peut donc pas inhiber la dégradation d'I- κ B α induite par l'IL-1 β . Nous avons également constaté que la protéine p65 restait bel et bien dans le cytoplasme des cellules lorsque celles-ci étaient stimulées en présence de U46619 ou de 8-*iso*-PGF_{2 α} . L'étude de l'action des agonistes sur la translocation de NF- κ B induite par l'IL-1 β n'a pas été effectuée, mais il serait intéressant de la réaliser afin de compléter les résultats. L'analyse de la liaison de NF- κ B à sa

séquence consensus n'a pas montré non plus d'effet des agonistes du récepteur TP seuls ou associés à l'IL-1 β .

Au niveau transcriptomique, nous avons observé quelques effets de ces modulateurs sur l'expression des gènes cibles de NF-kB. Les résultats les plus intéressants sont ceux obtenus pour l'IL-6, Cox-2 et MCP-1.

En effet, une augmentation de l'abondance de l'ARNm de l'IL-6 et de Cox-2 est observée lors de l'incubation des cellules en présence des agonistes et d'IL-1 β par rapport à l'effet de l'IL-1 β seule. Cet effet est plus marqué pour le U46619. Les données obtenues pour évaluer l'effet des antagonistes sont assez inattendues. Bien que le SQ29548 et le BM-520 soient bien capables de diminuer l'augmentation de l'expression des ARNm de Cox-2 et de l'IL-6 induite par le U46619 associé à l'IL-1 β , ils induisent cependant une surexpression de ces mêmes ARNm lorsqu'ils sont incubés en présence de 8-*iso*-PGF_{2 α} et de l'IL-1 β . Ces résultats suggèrent que l'effet du U46619 passe bien par le récepteur TP mais l'activation par le 8-*iso*-PGF_{2 α} en serait indépendante.

MCP-1 est une cytokine abondamment produite dans diverses maladies inflammatoires telle que l'athérosclérose. Elle joue un rôle très important dans le recrutement des monocytes dans les plaques d'athérosclérose. Cette chimiokine est sécrétée par différentes cellules en réponse à des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et d'IL-1 β . L'expression de son gène dans les cellules endothéliales dépend de l'action coopérative de NF-kB et de AP-1 (Martin *et al.*, 1997). Nous avons montré que les agonistes du récepteur TP sont capables d'induire une augmentation de l'ARNm de MCP-1. Lors de son dosage, nous avons remarqué que le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} étaient également capables d'augmenter la sécrétion de la cytokine dans les milieux de culture. Le pré-traitement des cellules avec les deux agonistes permettait de diminuer la production de MCP-1. Les cellules stimulées avec les agonistes du récepteur TP associés à de l'IL-1 β ne permettent pas d'augmenter la sécrétion de MCP-1 induite par l'IL-1 β seule. Ces résultats confirment que les modulateurs du récepteur TP n'influencent pas l'activité d'AP-1. Nos données sont similaires à celles obtenues sur des cellules endothéliales par l'équipe de Ishizuka (Ishizuka *et al.*, 1999), mais l'augmentation de la sécrétion de MCP-1 observée lors de l'incubation des agonistes seuls ne serait pas une conséquence de l'activation d'AP-1 dans les HVSMCs mais de l'augmentation de TGF- β . En effet, Ishizuka *et al.* ont également mis en évidence dans son étude l'implication de la PKC dans l'induction de l'expression de MCP-1 par le U46619 (Ishizuka *et al.*, 1999). Or, nous avons vu que la PKC était impliquée dans la régulation de l'expression du TGF- β (Craven *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été démontré que le gène de MCP-1 était un gène cible de TGF- β dans les cellules endothéliales, et que la cytokine sécrétée à son tour induisait le recrutement des VSMCs vers les cellules endothéliales (Ma *et al.*, 2007). Comme mentionné ci-dessus, il faudrait vérifier dans la suite du travail si le TGF- β est sécrété par les cellules HVSMCs quand elles sont incubées en présence des agonistes et si celui-ci influence l'expression de MCP-1.

Leitinger *et al.* (2001) ont comparé les effets du U46619 et du 8-*iso*-PGF_{2 α} sur l'expression de VCAM-1. Une stimulation des cellules endothéliales avec 10 μ M de U46619 pendant quatre heures induisait l'expression membranaire de VCAM-1, mais le 8-*iso*-PGF_{2 α} s'est lui montré incapable, avec une même concentration et un même temps d'incubation, d'affecter l'expression de VCAM-1. Le 8-*iso*-PGF_{2 α} n'a également montré aucun effet sur l'expression d'ICAM-1 en surface des cellules. De plus, l'adhérence des monocytes induite par le U46619 peut être bloquée par un anticorps anti-VCAM-1, alors que l'adhérence des monocytes induite par le 8-*iso*-PGF_{2 α} est indépendante de VCAM-1. Les auteurs ont démontré

que l'induction de l'adhérence des monocytes par le 8-*iso*-PGF_{2α} implique une voie dépendante de la PKA, alors que l'induction par le U46619 est principalement dépendante de la PKC.

L'ensemble de nos résultats et l'observation de Leitinger *et al.* (2001) relance l'hypothèse d'un récepteur spécifique au 8-*iso*-PGF_{2α}. Ce récepteur, s'il existe, devrait être proche du récepteur TP quant à son domaine de liaison mais serait couplé à une voie de signalisation distincte. Le 8-*iso*-PGF_{2α} pourrait donc agir sur le récepteur TP et sur un récepteur qui lui serait propre. La quantification de la sécrétion de MCP-1 nous a montré que ce dernier aurait un rôle proche du récepteur TP, c'est-à-dire un rôle pro-athérogène.

Une deuxième hypothèse qui pourrait expliquer l'action différente des deux agonistes serait une modification de la voie de signalisation du récepteur TP. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, plusieurs protéines G différentes peuvent se lier au récepteur TP. Les voies de signalisation qu'elles activent sont cependant différentes. Les effets d'une stimulation de la cellule pourraient avoir une répercussion sur la dimérisation des récepteurs, entraînant le couplage du récepteur TP avec une autre protéine G, une internalisation du récepteur ou encore une atténuation de la voie de signalisation par exemple.

En conclusion, avons donc constaté une diminution induite par le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2α} de l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1 induite par l'IL-1β. Cette diminution est relevée par l'ajout d'un antagoniste. Le SQ29548 et le BM-520 montrent un effet similaire, indiquant que les deux agonistes sont aussi puissants l'un que l'autre. Bayat *et al.* ont montré une augmentation de l'expression de VCAM-1 induite par l'IL-1β lors de l'activation du récepteur TP dans des VSMCs de rat. Ils ont montré l'implication de la voie JNK dans ce processus (Bayat *et al.*, 2008). Au contraire, nous avons constaté une sous-régulation de la part des agonistes, et cet effet ne passe pas par la voie JNK. C'est probablement la différence entre espèces qui explique ces résultats contradictoires. D'autre part, le U46619 et le 8-*iso*-PGF_{2α} sont tous deux capables de stimuler la sécrétion de MCP-1, mais cet effet ne passerait pas par l'activation du facteur de transcription NF-kB.

Les agonistes du récepteur TP pourraient donc avoir deux rôles opposés. D'une part, un rôle anti-inflammatoire par une diminution de l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 induite par l'IL-1β et d'autre part, un rôle pro-inflammatoire par la stimulation de cytokines pro-inflammatoires telle que MCP-1. Ces effets opposés n'impliqueraient cependant pas les facteurs de transcription AP-1 et NF-kB.

Ces résultats suggèrent que le TXA₂ et/ou le 8-*iso*-PGF_{2α} peuvent influencer les interactions entre monocytes et cellules musculaires lisses. Ces interactions jouent un rôle important dans le développement des plaques d'athérosclérose.

V. Bibliographie

- Agrotis, A., J. Saltis, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta 1 gene activation and growth of smooth muscle from hypertensive rats." *Hypertension* 23(5): 593-9.
- Bayat, H., S. Xu, et al. (2008). "Activation of thromboxane receptor upregulates interleukin (IL)-1beta-induced VCAM-1 expression through JNK signaling." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(1): 127-34.
- Beasley, D. (1999). "COX-2 and cytosolic PLA2 mediate IL-1beta-induced cAMP production in human vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol* 276(4 Pt 2): H1369-78.
- Belton, O. and Fitzgerald, D. J. (2003). "the three major pathways involved in arachidonic acid metabolism." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 5 (7).
<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03005854h.htm>
- Bergstroem, S., H. Danielsson, et al. (1964). "The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins." *J Biol Chem* 239: PC4006-8.
- Billington, C.K. et R.B. Penn (2003). "Signalling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle." *Respir Res* 4:2
- Bishop-Bailey, D., A. Burke-Gaffney, et al. (1998). "Cyclo-oxygenase-2 regulates inducible ICAM-1 and VCAM-1 expression in human vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 249(1): 44-7.
- Bos, C. L., D. J. Richel, et al. (2004). "Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction." *Int J Biochem Cell Biol* 36(7): 1187-205.
- Bradbury, D. A., R. Newton, et al. (2002). "Effect of bradykinin, TGF-beta1, IL-1beta, and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(4): L717-25.
- Braun, M., P. Pietsch, et al. (1997). "Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2568-75.
- Cherdon, C. (2007). "Etude de modulateurs du thromboxane A2 dans un modèle murin d'athérosclérose". Dissertation, Université de Liège, 2007.
- Cracowski, J. L., O. Berdeaux, et al. (2005). "[Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 3: Biomarkers and mediators in vascular physiology and disease]." *Pathol Biol (Paris)* 53(6): 364-8.
- Cracowski, J. L., P. Devillier, et al. (2001). "Vascular biology of the isoprostanes." *J Vasc Res* 38(2): 93-103.
- Craven, P. A., R. K. Studer, et al. (1996). "Thromboxane/prostaglandin endoperoxide-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells is signaled by protein kinase C-dependent increases in transforming growth factor-beta." *Hypertension* 28(2): 169-76.

- Cybulsky, M. I., K. Iiyama, et al. (2001). "A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis." *J Clin Invest* 107(10): 1255-62.
- Cyrus, T., Yao, Y., Rokach, J., Tang, L. X., and Pratico, D. (2003). Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice with established vascular lesions. *Circulation* 107, 521-523.
- de Winther, M. P., E. Kanters, et al. (2005). "Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5): 904-14.
- Dogne, J. M., J. Hanson, et al. (2006). "From the design to the clinical application of thromboxane modulators." *Curr Pharm Des* 12(8): 903-23.
- Dogne, J. M., J. Hanson, et al. (2005). "Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis." *Trends Pharmacol Sci* 26(12): 639-44.
- Facultés Universitaires Notre Dame de la paix à Namur, Atlas d'Histologie humaine et animale. (En ligne)
<http://webapps.fundp.ac.be/umbd/histohuma/histohuma/index.php?go=img&chap=45&pos=4&PHPSESSID=55c6282e567b38703accf6062085173c>
- Fan, J. and T. Watanabe (2003). "Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis." *J Atheroscler Thromb* 10(2): 63-71.
- Fitzpatrick, F. A. and R. C. Murphy (1988). "Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids." *Pharmacol Rev* 40(4): 229-41.
- Fu, J. Y., J. L. Masferrer, et al. (1990). "The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes." *J Biol Chem* 265(28): 16737-40.
- Fukunaga, M., N. Makita, et al. (1993). "Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): C1619-24.
- Gamble, J. R., S. Bradley, et al. (1995). "TGF-beta and endothelial cells inhibit VCAM-1 expression on human vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(7): 949-55.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). "Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis." *Thromb Haemost* 82(2): 722-6.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." *Cell* 104(4): 503-16.
- Hamberg, M. and B. Samuelsson (1967). "On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha." *J Biol Chem* 242(22): 5336-43.
- Hamberg, M., J. Svensson, et al. (1975). "Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(8): 2994-8.
- Hanson, J., "Design, synthesis and pharmacological evaluation of original nitrobenzenesulfonylureas and sulfocyanoguanidines as thromboxane A2 receptor antagonists." Thèse de doctorat, Université de Liège, 2007.

- Hirabayashi, T. and T. Shimizu (2000). "Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2)." *Biochim Biophys Acta* 1488(1-2): 124-38.
- Hirata, M., Y. Hayashi, et al. (1991). "Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor." *Nature* 349(6310): 617-20.
- Hirata, T., F. Ushikubi, et al. (1996). "Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation." *J Clin Invest* 97(4): 949-56.
- Huang et al. (2004). « Cell signalling through thromboxane A2 receptors." *Cell Signal* 16(5):521-533
- Huo, Y. and K. Ley (2001). "Adhesion molecules and atherogenesis." *Acta Physiol Scand* 173(1): 35-43.
- Ishizuka, T., S. Sawada, et al. (2000). "Thromboxane A2 (TXA2) receptor blockade suppresses monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by stimulated vascular endothelial cells." *Clin Exp Immunol* 120(1): 71-8.
- Jardillier J.-C., Delattre J., Durand G. (2003). "Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires." Flammarion.
- Kudo, I. (2004). "Diversity of phospholipase A2 enzymes. Foreword." *Biol Pharm Bull* 27(8): 1157.
- Kumar, A., E. Kingdon, et al. (2005). "The isoprostane 8-iso-PGF2alpha suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms." *Faseb J* 19(3): 443-5.
- Lambeau, G. and M. H. Gelb (2008). "Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2." *Annu Rev Biochem* 77: 495-520.
- Laroche, G., M. C. Lepine, et al. (2005). "Oligomerization of the alpha and beta isoforms of the thromboxane A2 receptor: relevance to receptor signaling and endocytosis." *Cell Signal* 17(11): 1373-83.
- Leitinger, N., J. Huber, et al. (2001). "The isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation." *Faseb J* 15(7): 1254-6.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." *Nature* 420(6917): 868-74.
- Lipoprotein Metabolism and Transport Pathways.2000. (En ligne)
<http://www.ovc.uoguelph.ca/BioMed/Courses/Public/Pharmacology/pharmsite/98409/Blood/hyperlipidemia.html>
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* 407(6801): 233-41.
- Ma, J., Q. Wang, et al. (2007). "MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration." *Blood* 109(3): 987-94.
- Martin, T., P. M. Cardarelli, et al. (1997). "Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1." *Eur J Immunol* 27(5): 1091-7.

- Murphy, R. C., S. Hammarstrom, et al. (1979). "Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4275-9.
- Nader Rifai; G. Russel Warnick; M. H. Dominiczak. (1997). "Handbook of lipoprotein testing 2nd edition." AACC Press (en ligne)
<http://books.google.fr/books?id=9p624MiI3mIC&pg=PA4&dq=lipoprotein+metabolism+and+transport+pathways#PPP1,M1>
- Nagata, T., Y. Uehara, et al. (1992). "Regulatory effect of thromboxane A2 on proliferation of vascular smooth muscle cells from rats." *Am J Physiol* 263(5 Pt 2): H1331-8.
- Nakahata, N. (2008). "Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology." *Pharmacol Ther* 118(1): 18-35.
- Newby, A. C. and A. B. Zaltsman (1999). "Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation." *Cardiovasc Res* 41(2): 345-60.
- Nguyen Hwangpo, T. and Iyengar, R. (2005) "Heterotrimeric G Proteins and Their Effector Pathways." *The G Protein-Coupled Receptors Handbook*. L. A. devi, Humana Press: 109-134. (en ligne)
<http://books.google.be/books?hl=fr&lr=&id=sW2SY9zzydMC&oi=fnd&pg=PA109&dq=%22Heterotrimeric+G+Proteins+and+their+Effector+Pathways.%22&ots=NWvYokBh57&sig=6RyKFxG3dxTLxV-ELsOiebZzZ2Q#PPP1,M1>
- Ochocka, A. M. and T. Pawelczyk (2003). "Isozymes delta of phosphoinositide-specific phospholipase C and their role in signal transduction in the cell." *Acta Biochim Pol* 50(4): 1097-110.
- Palmer, M. A., P. J. Piper, et al. (1970). "The release of rabbit aorta contracting substance (RCS) from chopped lung and its antagonism by anti-inflammatory drugs." *Br J Pharmacol* 40(3): 581P-582P.
- Patrono, C. and G. A. FitzGerald (1997). "Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2309-15.
- Pratico, D. (2008). "Prostanoid and isoprostanoid pathways in atherogenesis." *Atherosclerosis*.
- Rolin, S., J. M. Dogne, et al. (2001). "Activity of a novel dual thromboxane A(2)receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65(2): 67-72.
- Rolin, S., J. Hanson, et al. (2007). "BM-520, an original TXA2 modulator, inhibits the action of thromboxane A2 and 8-iso-prostaglandin F2alpha in vitro and in vivo on human and rodent platelets, and aortic vascular smooth muscles from rodents." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84(1-2): 14-23.
- Sasaki, M., K. Miyosawa, et al. (2006). "Physiological significance of thromboxane A(2) receptor dimerization." *J Pharmacol Sci* 100(4): 263-70.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." *Cell* 47(6): 921-8.

- Serhan, C. N., M. Hamberg, et al. (1984). "Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(17): 5335-9.
- Smith, W. L. (2008). "Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases." *Trends Biochem Sci* 33(1): 27-37.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt, et al. (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." *Annu Rev Biochem* 69: 145-82.
- Stryer . (2002) "Special topic: Arachidonate, Eicosanoids and Endocannabinoids." ch 24 623-625.(en ligne)
<http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/CHEM445/special/arachidonate.html>
- Tang, L., T. Ding, et al. (2008). "Additive anti-atherogenic effect of thromboxane receptor antagonism with 12/15lipoxygenase gene disruption in apolipoprotein E-deficient mice." *Atherosclerosis* 199(2): 265-70.
- Tang, M., T. Cyrus, et al. (2005). "Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F2alpha-III: evidence from apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice." *Circulation* 112(18): 2867-74.
- Tergaonkar, V. (2006). "NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target." *Int J Biochem Cell Biol* 38(10): 1647-53.
- Terrillon, S. and M. Bouvier (2004). "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization." *EMBO Rep* 5(1): 30-4.
- Toussaint J.-F, M.-P. Jacob., L. Lagrost, J.Chapman (2003). "L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques." Elsevier Masson (en ligne)
http://books.google.be/books?id=w9uEFmo27UQC&pg=PA109&lpg=PA109&dq=mol%C3%A9cules+adh%C3%A9rence+ath%C3%A9roscl%C3%A9rose&source=web&ots=Y6-jf9TI8T&sig=Qebs9-p_tb2BkfTXlpNE30XERd8&hl=fr&sa=X&oi=book_result&resnum=1&ct=result#PPA21,M1
- University of Wisconsin, Syllabus and study Aids of Biochemistry. 2006 (En ligne)
<http://www.uwsp.edu/chemistry/tzamis/ch260/lipoprotein.jpg>
- Wang, C. C., W. N. Lin, et al. (2005). "Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB in IL-1beta-induced VCAM-1 expression in human tracheal smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(2): L227-37.
- Young, J. L., P. Libby, et al. (2002). "Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis." *Thromb Haemost* 88(4): 554-67.
- Zhang, W., Y. Zhang, et al. (2008). "Transcriptional Down-Regulation of Thromboxane A(2) Receptor Expression via Activation of MAPK ERK1/2, p38/NF-kappaB Pathways." *J Vasc Res* 46(2): 162-174.
- Zhang, Y., M. Adner, et al. (2004). "Interleukin-1beta attenuates endothelin B receptor-mediated airway contractions in a murine in vitro model of asthma: roles of endothelin converting enzyme and mitogen-activated protein kinase pathways." *Clin Exp Allergy* 34(9): 1480-7.